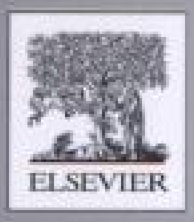




Collection dirigée par
Jean-Claude Nicolas

Mycobacterium tuberculosis et mycobactéries atypiques

Coordinateurs
François Denis
Christian Perronne

Mycobacterium tuberculosis et mycobactéries atypiques

Illustrations de couverture :
À gauche : Image thoracique d'une tuberculose plus aspergillome avec volumineuse image cavitaire du Fowler droit avec niveau hydroaérique et image en « grelot », © Antoine Maubon. À droite en haut : Examen direct d'une mycobactérie coloration à l'auramine, © Christian Martin. À droite au milieu : Colonies d'une mycobactérie atypique scotochromogène (*M. szulgai*) sur milieu de Löwenstein, © Véronique Vincent. À droite en bas : Examen direct de *Mycobacterium tuberculosis* coloration de Ziehl-Neelsen, © Véronique Vincent.

23, rue Linois, 75724 Paris cedex 15, France
http://france.elsevier.com

Réalisation éditoriale : Nathalie Morellato
Conception graphique : Véronique Lentaigne

Imprimé en France par l'imprimerie Stedi, 1, boulevard Ney, 75018 Paris
Dépôt légal : 8246 - mars 2004

ISBN : 2-84299-590-2
ISSN : 1631-3623

Mycobacterium tuberculosis et mycobactéries atypiques

Coordinateurs
François Denis,
Christian Perronne



ELSEVIER



Collection dirigée par Jean-Claude Nicolas

Cytomégalovirus
Coordinateur Marie-Christine Mazeron
ISBN : 2-84299-267-9

Diarrhées infectieuses aiguës
Coordinateur Rémy Teyssou
ISBN : 2-84299-336-5

Hépatites virales entérotransmissibles
Coordinateur Élisabeth Nicand
ISBN : 2-84299-323-3

Infections virales et toxoplasmose maternofœtales
Coordinateurs Liliane Grangeot-Keros, François Audibert
ISBN : 2-84299-265-2

Infections virales respiratoires - tome 1
Grippe et infections virales des voies aériennes supérieures
Coordinateur François Freymuth
ISBN : 2-84299-266-0

Infections virales respiratoires - tome 2
Bronchopneumopathies virales
Coordinateur François Freymuth
ISBN : 2-84299-338-1

Infections virales sexuellement transmissibles
Coordinateur Michel Segondy
ISBN : 2-84299-484-1

Méningites bactériennes communautaires
Coordinateur Édouard Bingen
ISBN : 2-84299-268-7

Mycoplasmes et chlamydiae
Coordinateur Christiane Bébéar
ISBN : 2-84299-337-3

Mycoses d'importation
Coordinateurs Dominique Chabasse, Michel Develoux
ISBN : 2-84299-479-5

Parasitoses et mycoses courantes de la peau et des phanères
Coordinateurs Dominique Chabasse, Éric Caumes
ISBN : 2-84299-480-9

***Mycobacterium tuberculosis* et mycobactéries atypiques**
Coordinateurs François Denis, Christian Perronne
ISBN : 2-84299-590-2

Virus de l'hépatite C
Coordinateurs Paul Dény, Dominique Roulot
ISBN : 2-84299-447-7

Virus des hépatites B et Delta
Coordinateurs François Denis, Christian Trépo
ISBN : 2-84299-593-7

Auteurs

Patrick Berche
Service de microbiologie, UFR Necker, 156, rue de Vaugirard, 75015 Paris
berche@necker.fr

Christophe Billy
Centre hospitalier François-Quesnay, 2, boulevard Sully, 78200 Mantes-la-Jolie
c.billy@ch-mantes-la-jolie.rss.fr

Emmanuelle Cambau
Groupe hospitalier Charles-Foix, 7, avenue de la République, 94205 Ivry-sur-Seine cedex
emmanuelle.cambau@cfx.ap-hop-paris.fr

Caroline Debrock
Service de bactériologie-virologie-hygiène, CHU Dupuytren, 2, avenue Martin-Luther-King, 87042 Limoges cedex
caroline.debrock@chu-limoges.fr

Bénédicte Decludt
Institut de veille sanitaire, 12, rue du Val d'Oise, 94415 Saint-Maurice cedex
b.decludt@invs.sante.fr

François Denis
Service de bactériologie-virologie-hygiène, CHU Dupuytren, 2, avenue Martin-Luther-King, 87042 Limoges cedex
fdenis@unilim.fr

Joël Gaudelus
Service de pédiatrie, CHU Jean-Verdier, 93140 Bondy
joel.gaudelus@jvr.ap-hop-paris.fr

M.-Cristina Gutierrez
Centre de référence des mycobactéries, Institut Pasteur, 25-28, rue du Docteur-Roux, 75724 Paris cedex 15
cirsgupe@pasteur.fr

Jean-Louis Hermann
Service de microbiologie, hôpital Saint-Louis, 1, avenue de Vellefaux, 75475 Paris cedex 10
jean-louis.hermann@sls.ap-hop-paris.fr

Vincent Jarlier
Laboratoire de bactériologie-hygiène et Centre national de référence pour la résistance des mycobactéries aux antituberculeux, 91, boulevard de l'Hôpital, 75634 Paris cedex 13
vincent.jarlier@psl.ap-hop-paris.fr

Philippe-Henri Lagrange
Laboratoire de microbiologie, hôpital Saint-Louis, 1, avenue de Vellefaux, 75475 Paris cedex 10
philippe-henri.lagrange@sls.ap-hop-paris.fr

Daniel Lévy-Bruhl
Département des maladies infectieuses, Institut de veille sanitaire, 12, rue du val d'Osne, 94415 Saint-Maurice cedex
d.levybruhl@invs.sante.fr

Hélène Marchandin
Laboratoire de bactériologie-virologie, hôpital Arnaud-de-Villeneuve, 371, avenue du Doyen-Gaston-Giraud, 34295 Montpellier cedex 5
h-marchandin@chu-montpellier.fr

Christian Martin
Service de bactériologie-virologie-hygiène, CHU Dupuytren, 2, avenue Martin-Luther-King, 87042 Limoges cedex
christian.martin@unilim.fr

Marcelle Mounier
Service de bactériologie-virologie-hygiène, CHU Dupuytren, 2, avenue Martin-Luther-King, 87042 Limoges cedex
marcelle.mounier@chu-limoges.fr

Christian Perronne
Service des maladies infectieuses et tropicales, hôpital Raymond-Poincaré, 104, boulevard Raymond-Poincaré, 92380 Garches
c.perronne@rpc.ap-hop-paris.fr

Marie-Cécile Ploy
Service de bactériologie-virologie-hygiène, CHU Dupuytren, 2, avenue Martin-Luther-King, 87042 Limoges cedex
marie-cecile.ploy@unilim.fr

Françoise Portaels
Unité de mycobactériologie, institut de médecine tropicale, Nationalestraat 155, Anvers (Antwerp), Belgique
portaels@itg.be

Jérôme Robert
Laboratoire de bactériologie-hygiène et Centre national de référence pour la résistance des mycobactéries aux antituberculeux, 91, boulevard de l'Hôpital, 75634 Paris cedex 13
jrobert@chups.jussieu.fr

Chantal Truffot-Pernot
Laboratoire de bactériologie-hygiène et Centre national de référence pour la résistance des mycobactéries aux antituberculeux, 91, boulevard de l'Hôpital, 75634 Paris cedex 13
c.truffot@psl.ap-hop-paris.fr

David Trystram
Laboratoire de bactériologie-hygiène et Centre national de référence pour la résistance des mycobactéries aux antituberculeux, 91, boulevard de l'Hôpital, 75634 Paris cedex 13
dtrystram@chups.jussieu.fr

Philippe Van de Perre
Laboratoire de bactériologie-virologie, hôpital Arnaud-de-Villeneuve, 371, avenue du Doyen-Gaston-Giraud, 34295 Montpellier cedex 5
p-van_de_perre@chu-montpellier.fr

Nicolas Veziris
Laboratoire de bactériologie, faculté de médecine Pitié-Salpêtrière, 91, boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris
veziris@chups.jussieu.fr

Véronique Vincent
Centre de référence des mycobactéries, Institut Pasteur, 25-28, rue du Docteur-Roux, 75724 Paris cedex 15
vvincent@pasteur.fr

Alain Wargnier
Service de microbiologie, hôpital Saint-Louis, 1, avenue de Vellefaux, 75475 Paris cedex 10
alain.wargnier@sls.ap-hop-paris.fr

Mycobacterium tuberculosis et mycobactéries atypiques

Avant-propos

Si le diagnostic de tuberculose constitue une préoccupation quotidienne de tous les laboratoires de microbiologie du monde, celui des mycobactéries atypiques ne concerne qu'un petit nombre d'entre eux.

L'enjeu est important puisque, pour l'Organisation mondiale de la santé et pour la seule année 2000, on considère qu'il y a eu 10,2 millions de nouveaux cas de tuberculose à l'échelle de la planète (incidence 163 pour 100 000) avec un nombre de décès liés à cette maladie sur la même période estimé à 3,5 millions de personnes.

Les cas de tuberculose se répartissaient en 2000 entre l'Asie : 3,9 millions, le Pacifique Ouest : 2,2 millions, l'Afrique : 2 millions, l'est de la Méditerranée : 870 000 cas, le continent américain (États-Unis, Canada exclus) : 645 000 cas, avec sur l'ensemble de la planète 1,4 million de ces cas survenant en co-infection avec le virus du sida.

Les données cumulées de tuberculose estimées pour la période 1990–1999 sont de 1,1 million pour l'Europe de l'Ouest.

En France, en 1997, 6 832 cas de tuberculose ont été déclarés. L'incidence en France métropolitaine est de 11,4 cas/100 000 habitants et la prévalence de l'infection à VIH est d'au moins 6 % parmi les cas de tuberculose.

Ces infections dues aux mycobactéries sont diagnosticables et curables.

Vu l'ampleur du problème que pose la tuberculose, mais aussi des problèmes parfois délicats posés par les mycobactéries atypiques à l'origine de certaines entités cliniques souvent méconnues tel l'ulcère de Buruli (dû à *M. ulcerans*) et des pathologies orphelines qui peuvent être dues à des mycobactéries, il était utile d'écrire un ouvrage sur le diagnostic des mycobactérioses actualisé à l'aube du XXIe siècle, ouvrage faisant la part respective des techniques de diagnostic moléculaire et plus traditionnelles. Nous avons tenté de répondre à cette attente en rédigeant ce livre.

Cette synthèse correspond à une attente du fait que, malgré l'ampleur du sujet, il n'existe que peu d'ouvrages en langue française sur les mycobactéries et sur le diagnostic microbiologique des infections dues aux mycobactéries, qui soient accessibles tant aux cliniciens qu'aux biologistes.

Pour cet ouvrage, nous avons fait appel à des spécialistes épidémiologistes, cliniciens, bactériologistes, immunologistes, préoccupés au quotidien par les mycobactérioses.

Nous espérons que ce travail lisible à plusieurs niveaux tant par le généraliste que par le spécialiste répondra à l'attente de tous.

Professeur François Denis
Professeur Christian Perronne

« Ces microbes acido-alcoolo-résistants sont extrêmement communs dans la nature...
Quelques-uns sont virulents et parmi ces derniers, les mieux connus sont le bacille tuberculeux de Koch, le bacille de la lèpre découvert par Hansen...
La très grande majorité des autres est essentiellement saprophyte...
Mais certains de ces derniers sont peut-être également susceptibles d'être pathogènes »

Albert Calmette, 1920

« Il est d'autres moyens..., mais qui jouent un rôle primordial dans la lutte contre les maladies.
L'un des plus importants est la rapidité du diagnostic. L'aide qu'y apporte le laboratoire est des plus précieuses. Plus vite la maladie est reconnue, plus vite on peut prendre les précautions utiles pour empêcher sa diffusion ».
« Tout l'arsenal médical est provisoire. Ne rien imposer de définitif, laisser une certaine liberté pour le choix des méthodes... laisser la part aux simplifications, aux progrès, aux audaces doit être la règle ».

Charles Nicolle, *Le Destin des Maladies Infectieuses*, 1933

« Donnez-moi un laboratoire et je soulèverai le monde. »

Louis Pasteur

Mycobacterium tuberculosis et mycobactéries atypiques

Chapitre 1

Épidémiologie de la tuberculose

Bénédicte Decludt

Dans les pays occidentaux, la tuberculose a décliné depuis le XIXe siècle avec l'amélioration des conditions de vie et les mesures de santé publique destinées à interrompre la transmission. Dans les années 1950, l'arrivée de traitements antibiotiques efficaces a donné l'impression que l'éradication de la maladie était inéluctable à brève échéance. Cependant, la tuberculose n'est toujours pas une pathologie du passé et la réalité actuelle ne confirme pas ces prédictions optimistes. Le déclin de la tuberculose semble avoir pris fin dans de nombreux pays et, au niveau mondial, la tuberculose demeure la première cause de mortalité due à un agent infectieux unique.

1. Histoire naturelle de la tuberculose

L'histoire naturelle de la tuberculose, maladie infectieuse due au bacille de Koch (BK) transmissible par voie aérienne, conditionne la situation épidémiologique. Le risque d'infection d'un sujet exposé dépend essentiellement de facteurs extérieurs comme la richesse en bacilles émis par le malade, la proximité de celui-ci, la durée d'exposition et l'environnement. L'infection tuberculeuse ou primo-infection consécutive à l'inhalation du bacille est le plus souvent contrôlée à ce stade par une réaction immunitaire efficace et la seule trace de l'infection est une réaction tuberculinique positive. À la suite de l'infection, la tuberculose va se développer en deux mécanismes distincts : par progression rapide de l'infection primaire, ou après une période de latence qui peut atteindre plusieurs dizaines d'années (Fig. 1.1). La probabilité d'évolution vers une tuberculose maladie à la suite d'une infection est d'environ 10 % pour le reste

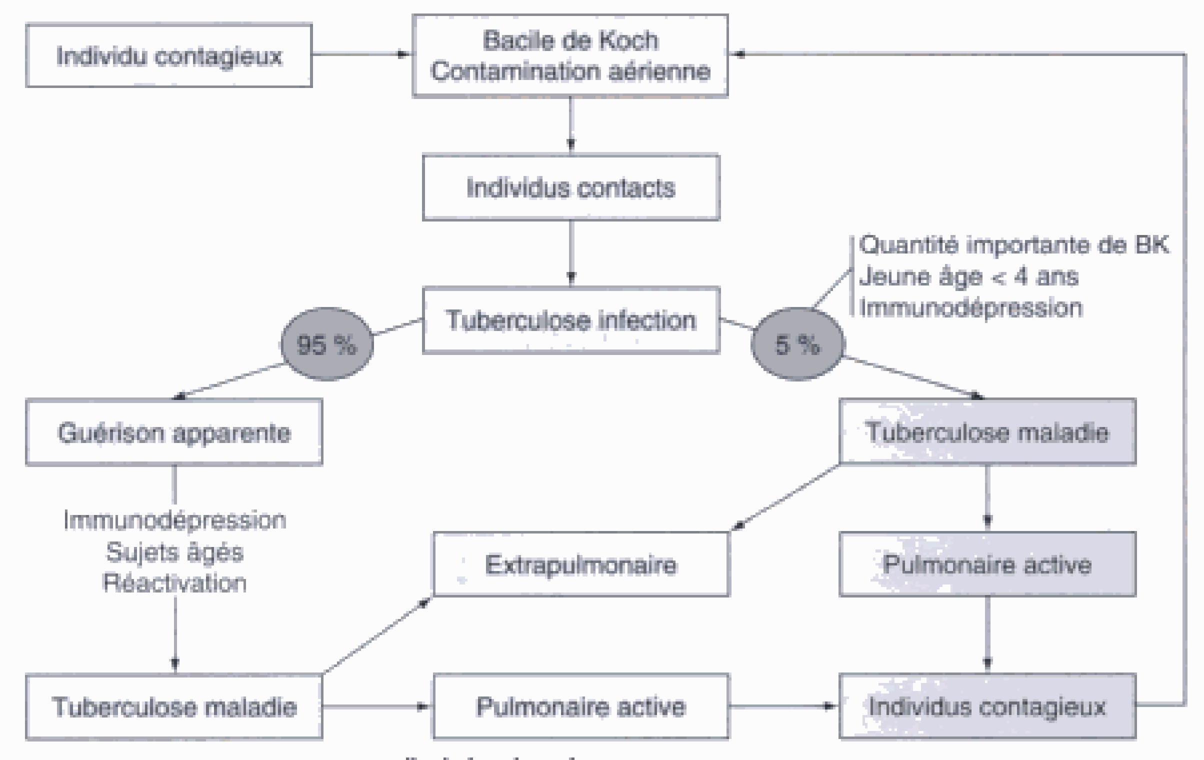


Figure 1.1. Histoire naturelle de la tuberculose.

de la vie mais est maximale pendant les deux années qui suivent l'infection (5 %). Ce risque varie en fonction des individus et est beaucoup plus élevé chez les jeunes enfants et chez les personnes en immunosuppression. Chez les personnes infectées par le VIH, ce risque serait de 8 à 10 % par an.

2. La tuberculose dans le monde

La tuberculose est un problème de santé majeur à l'échelle mondiale avec, d'après les estimations de l'OMS, près de huit millions de personnes atteintes chaque année et deux millions de décès. Le nombre de tuberculeux dans le monde est très inégalement réparti. Les pays les plus touchés sont les pays les plus pauvres où se retrouvent 95 % des cas de tuberculose et 98 % des décès (Fig. 1.2). Cette situation est fortement liée à la progression de l'épidémie de VIH/sida dans ces pays et plus particulièrement en Afrique. Environ un tiers de la population infectée par le VIH est co-infectée par *M. tuberculosis* dont 70 % vivent en Afrique sub-saharienne et 22 % en Asie du Sud-Est.

3. La tuberculose en Europe

Crée en 1996, le Réseau européen de surveillance de la tuberculose (EuroTB) regroupe 51 pays de la région OMS de l'Europe. En 2000, l'incidence de la tuberculose varie fortement selon trois zones géographiques de 13 cas pour 100 000 habitants en Europe de l'Ouest, 40 cas pour 100 000 en Europe centrale et 90 cas pour 100 000 en Europe de l'Est en 2000 (Fig. 1.2). Depuis

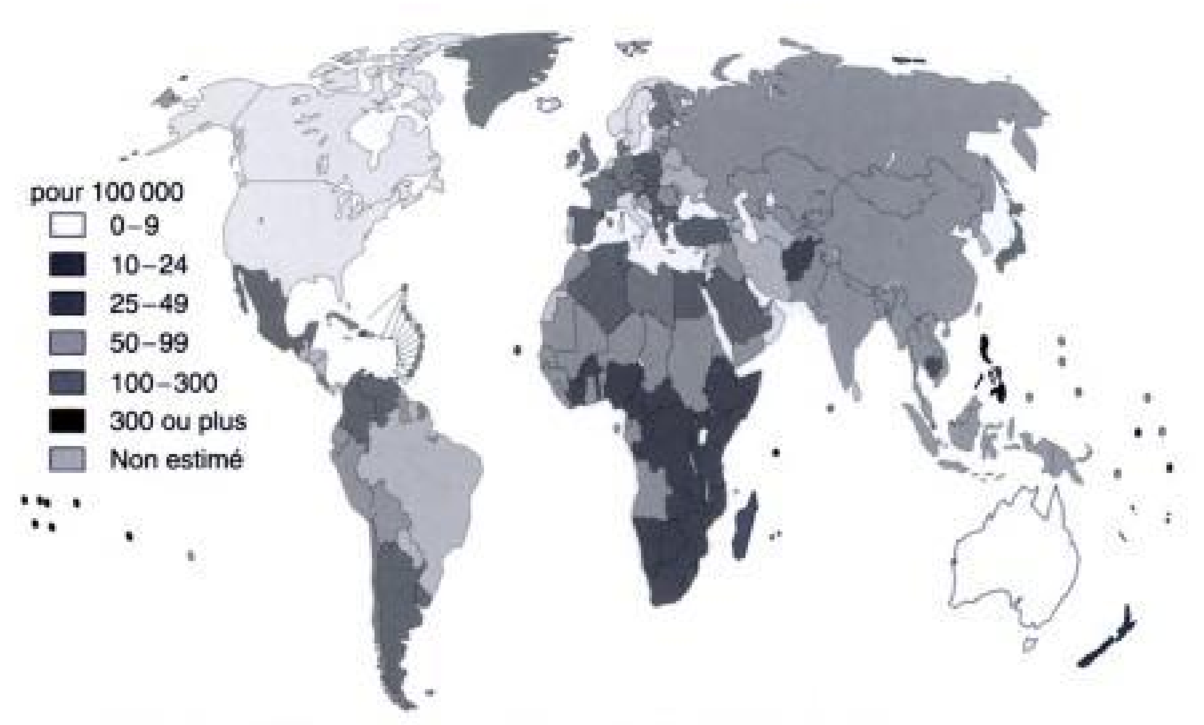


Figure 1.2. Incidence estimée de la tuberculose dans le monde (OMS, 2000).

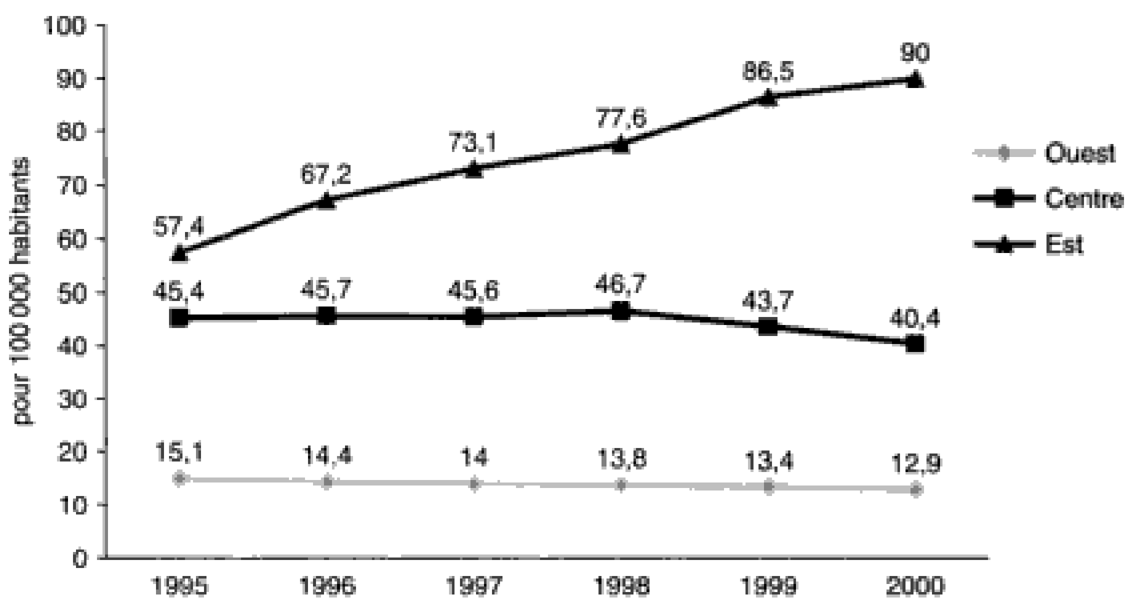


Figure 1.3. Taux d'incidence de la tuberculose déclarée (région OMS de l'Europe*, 1995–2000). *Ouest : Union européenne + Andorre, Islande, Malte, Monaco, Norvège, Saint-Marin, Suisse ; Centre : 13 pays d'Europe centrale ; Est : 15 pays de l'ex-URSS.

1995, le taux de notification a diminué de 15 % en Europe de l'Ouest alors qu'il est en forte augmentation dans les pays situés en Europe de l'Est (+ 57 %) (Fig. 1.3). Les données européennes sont disponibles sur le site www.eurotb.org.

4. La tuberculose en France

4.1. Objectifs et organisation de la surveillance épidémiologique

La tuberculose est une maladie à déclaration obligatoire (DO) depuis 1964. Depuis les lois de décentralisation de 1983, la prévention et le dépistage de la tuberculose sont de la compétence des conseils généraux. La surveillance épidémiologique est restée de la compétence de l'État. Elle permet au niveau national de suivre les tendances de la maladie et l'évolution des groupes à risque. Au niveau départemental, elle permet de réaliser les investigations autour des cas et d'orienter les actions de lutte antituberculeuse (Fig. 1.4). Les médecins sont tenus de signaler sans délai à la Direction départementale des affaires sanitaires et sociales (DDASS) tout cas de tuberculose dans un but d'intervention suivi d'une notification à visée épidémiologique (décrets 1999-362, 1999-363, 2001-437). Les centres nationaux de référence (CNR) pour la tuberculose sont également une source d'information sur l'épidémiologie de la tuberculose en France. Le CNR des mycobactéries (Institut Pasteur, Paris) réalise l'expertise et le typage de souches et participe à la surveillance épidémiologique. Le CNR de la résistance des mycobactéries aux antituberculeux (Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris) coordonne la surveillance de la tuberculose multirésistante et la surveillance de la résistance aux antituberculeux de première ligne.

Cliniciens et biologistes déclarants

Signalement sans délai

puis Notification

CNRs Institut Pasteur,
Hôp. Pitié-Salpêtrière

Surveillance, alerte

DDASS

Conseil Général

Surveillance
Validation, logiciel BK

Enquête autour du cas
Lutte antituberculeuse

Diffusion

InVS

DGS

Site DO InVS
(*données brutes non validées*)
Synthèse annuelle BEH
www.invs.sante.fr

Epidémiologie
Appui investigations
Etudes ponctuelles

Euro TB
OMS

Figure 1.4. Circuit de déclaration de la tuberculose. InVS : Institut de veille sanitaire ; DGS : Direction générale de la santé ; BEH : Bulletin épidémiologique hebdomadaire.

Les critères de déclaration sont les suivants :
– Tuberculose maladie :
Cas confirmé : maladie due à une mycobactérie du complexe *tuberculosis* prouvée par la culture (*Mycobacterium tuberculosis, M. bovis* ou *M. africanum*) ;
Cas probable :
- signes cliniques et/ou radiologiques compatibles avec une tuberculose ;
- et décision de traiter le patient avec un traitement antituberculeux standard.

– Infection tuberculeuse (primo-infection) chez un enfant de moins de 15 ans (à partir de 2003) : intradermo à la tuberculine (IDR) à 10 U positive sans signe clinique ni paraclinique (induration > 15 mm si BCG ou augmentation de 10 mm par rapport à une IDR datant de moins de deux ans) ou IDR phlycténulaire.
La notification des cas d'infection tuberculeuse chez les enfants a été mise en place en 2003 et permettra de réaliser des enquêtes à la recherche du contaminateur et d'interrompre la chaîne de transmission.
Les services le lutte antituberculeuse qui ont pour mission de réaliser les investigations autour d'un cas de tuberculose en collaboration avec le clinicien n'avaient pas été sollicités pour 47 % des cas déclarés et pour 39 % des cas pulmonaires bacillifères.

4.2. Évolution de l'incidence

En France métropolitaine, l'incidence est passée de 60 cas pour 100 000 habitants en 1972 (31 167 cas déclarés) à 15 cas pour 100 000 en 1991 (8 480 cas) avec une décroissance régulière de 7 % environ par an (Fig. 1.5). Au début des années 1990 est observé un renversement de tendance avec une augmentation du nombre de cas déclarés de 11 % entre 1991 et 1993, plus marquée en Île-de-France. Les causes de cette recrudescence semblent multifactorielles : dégradation des conditions socio-économiques touchant plus particulièrement certaines populations, migration en provenance de pays

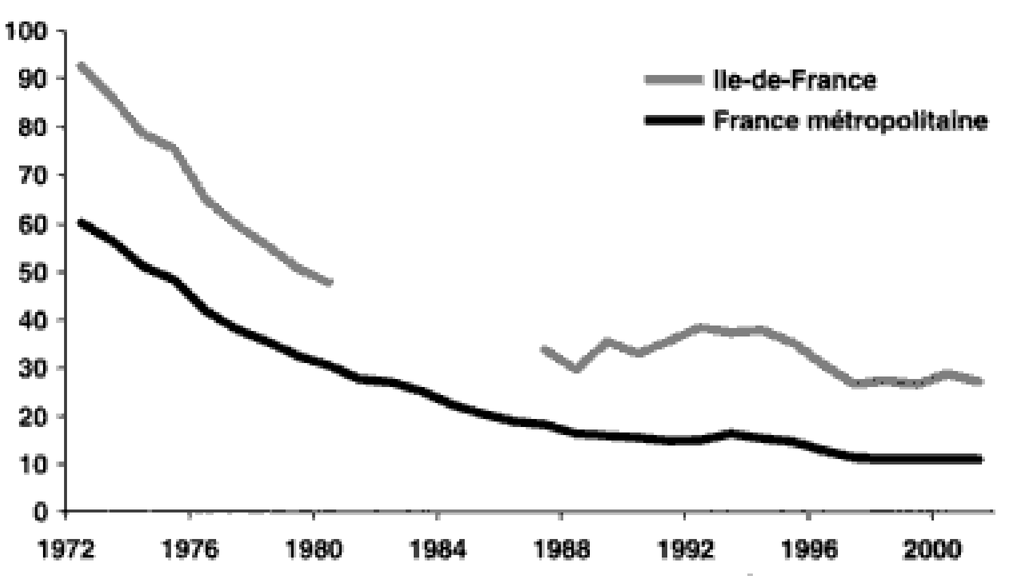


Figure 1.5. Incidence de la tuberculose en France métropolitaine et en Île-de-France (1972–2001).

à forte endémie tuberculeuse et effet amplificateur de l'épidémie de sida. La recrudescence plus marquée en Île-de-France serait le reflet de la concentration de populations à risque dans la région et éventuellement d'une meilleure déclaration des cas par les médecins sensibilisés au contexte épidémique de cette période. L'incidence a ensuite de nouveau diminué de 9 % en moyenne par an jusqu'en 1997 et s'est stabilisée depuis avec en moyenne 11 cas pour 100 000 habitants soit environ 6 000 cas déclarés par an. En 2001, l'incidence était de 10,8 cas pour 100 000 habitants avec 6 484 cas déclarés.
Une recherche d'infection par le VIH est plus souvent réalisée dans les départements d'outre-mer qu'en métropole (70 % versus 49 % en 2001). La proportion de cas à sérologie positive parmi les cas testés était de 11 % en métropole et de 29 % dans les DOM.
Le pourcentage de tuberculeux infectés par le VIH parmi les cas testés a diminué depuis 1994 de 50 % en métropole, est stable dans les DOM, possible reflet d'une meilleure prise en charge à la fois prophylactique vis-à-vis de la tuberculose et thérapeutique vis-à-vis de l'infection par le VIH (Fig. 1.6).

4.3. Distribution géographique

La maladie se concentre en majorité en Île-de-France où 41 % des cas sont survenus alors que la région n'héberge que 19 % de la population française. L'incidence y atteint 27 cas pour 100 000 habitants et à Paris 48,7 cas pour 100 000 habitants, soit 4,5 fois l'incidence nationale. Le deuxième département le plus touché est la Seine-Saint-Denis avec 506 cas déclarés, soit une incidence de 36,6 cas pour 100 000 habitants (Fig. 1.7). Dans l'ensemble des autres régions, l'incidence est inférieure à 10 cas pour 100 000 habitants.
La situation observée en Île-de-France est également retrouvée dans les autres grandes métropoles européennes où des incidences élevées sont observées (Fig. 1.8). L'incidence actuelle à Paris est similaire à celle de la ville de New York en 1991 qui avait été attribuée à une désorganisation des services

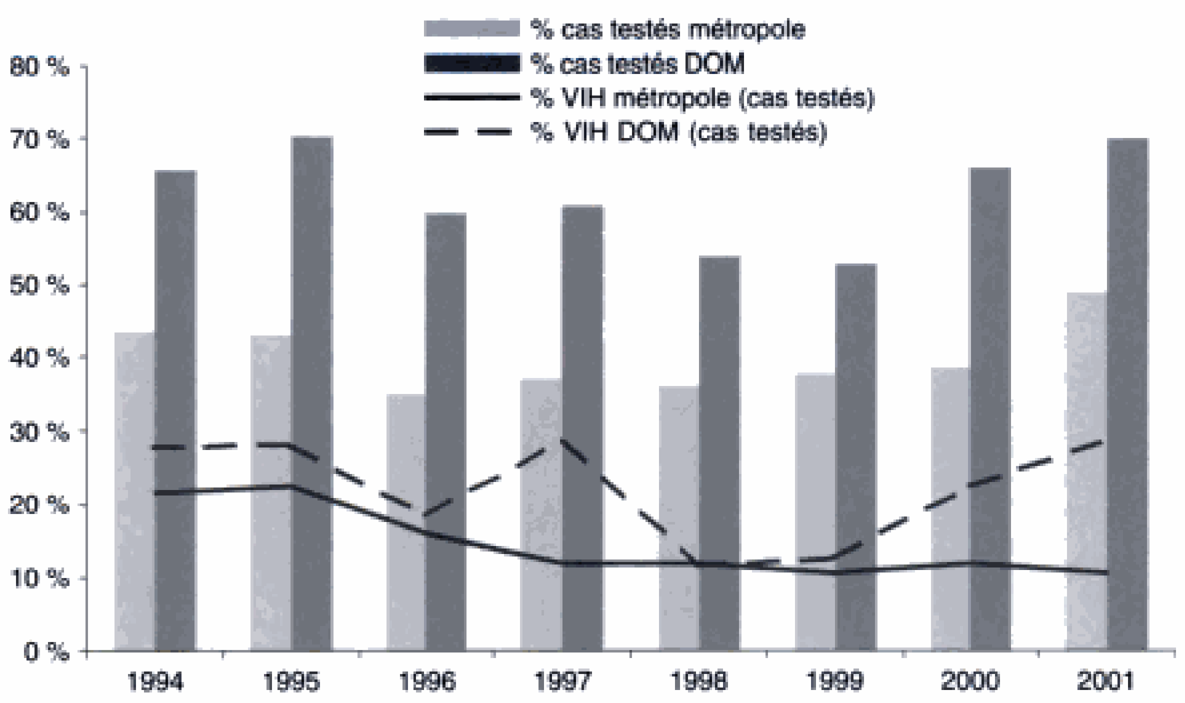


Figure 1.6. Proportion de cas de tuberculose infectés par le VIH (France métropolitaine et DOM, 1994–2001).

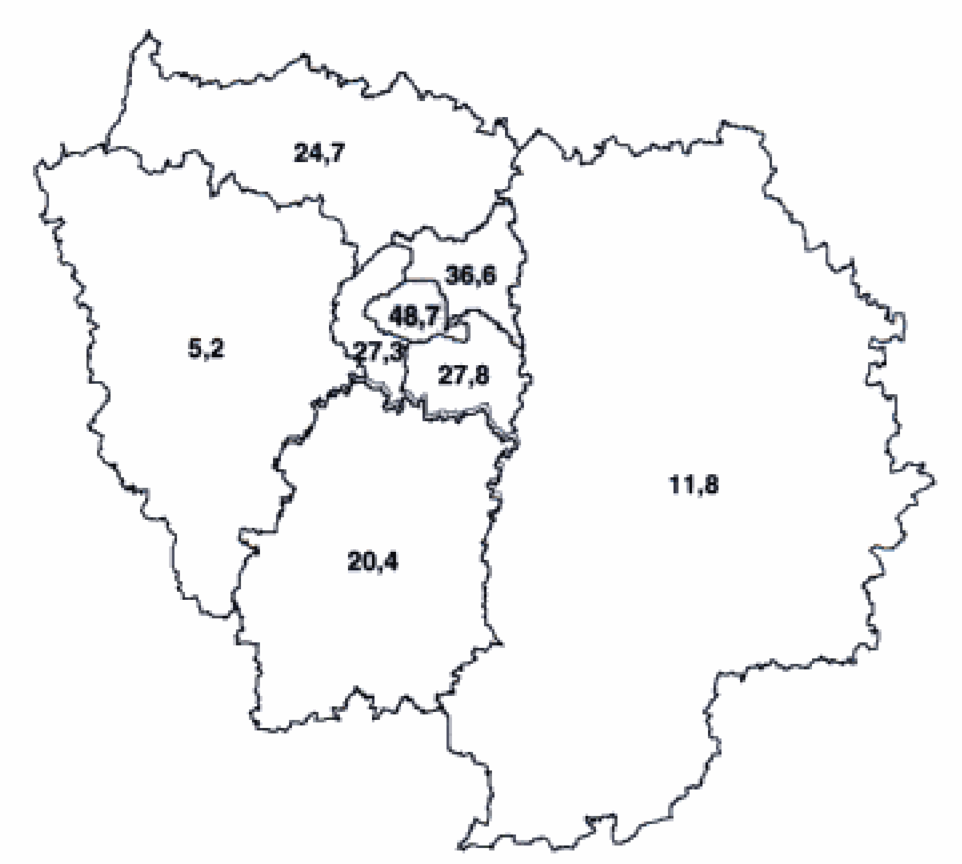


Figure 1.7. Incidence de la tuberculose dans les départements d'Île-de-France (2001).

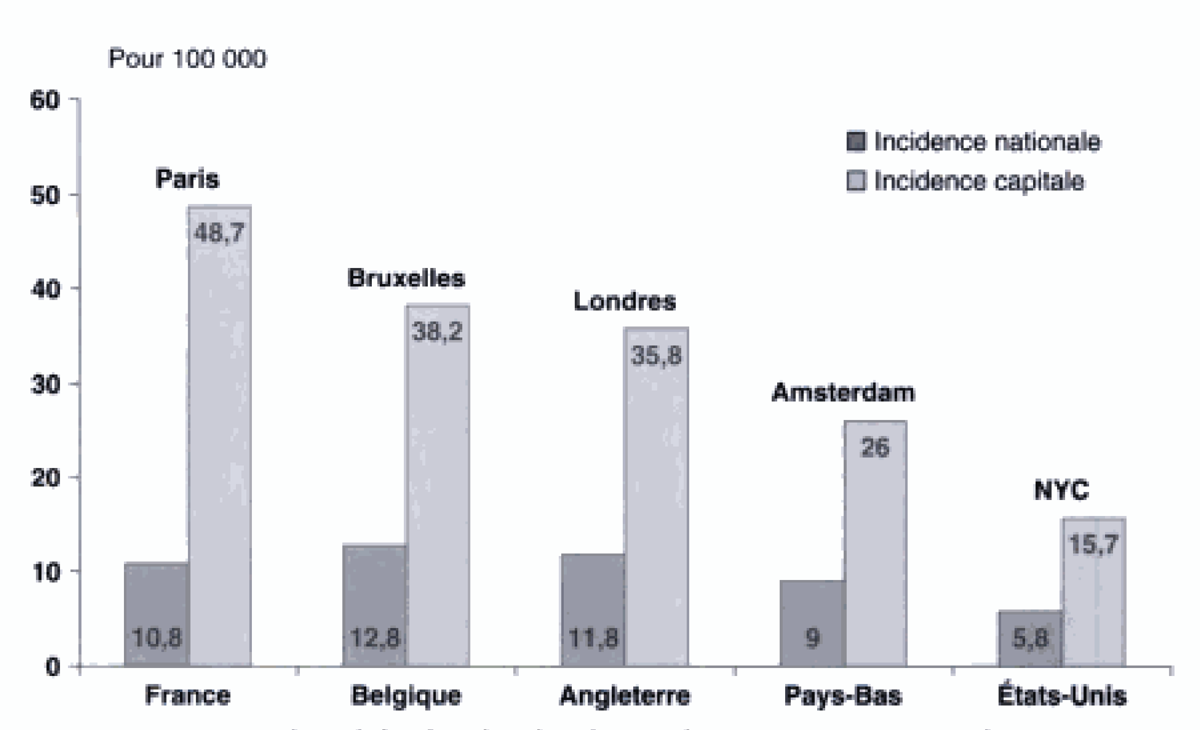


Figure 1.8. Incidence de la tuberculose dans des capitales européennes et à New York (2001).

de lutte antituberculeuse et à des restrictions budgétaires. La mise en place d'un programme de lutte cohérent associé à des moyens appropriés a permis de diminuer fortement cette incidence.

4.4. Caractéristiques sociodémographiques

La tuberculose est plus fréquente chez les hommes (13,5 cas pour 100 000 en 2001) que chez les femmes (8,7 cas pour 100 000). Globalement, l'incidence augmente avec l'âge pour atteindre 22 cas pour 100 000 personnes de 75 ans et plus (Fig. 1.9). En effet, le risque de développer une tuberculose maladie augmente avec l'âge, résultant le plus souvent d'une réactivation endogène.

En revanche, la distribution par âge est très différente selon l'origine du malade. Chez les sujets en provenance de pays d'endémie, le risque est maximal chez les adultes jeunes pour lesquels l'incidence est 16 fois plus élevée que chez les sujets de nationalité française en 2001. Elle atteint 87 cas pour 100 000 personnes de nationalité étrangère âgées de 25 à 39 ans versus 5 cas pour 100 000 personnes de nationalité française de cette même tranche d'âge (Fig. 1.10).

Le principal changement survenu dans l'épidémiologie de la tuberculose concerne l'origine des cas déclarés. La comparaison de l'incidence de la tuberculose en fonction de l'origine entre 1997 et 2001 montre que le taux chez les personnes de nationalité française a chuté de 6 % au cours de cette période, alors que le taux chez les personnes de nationalité étrangère a augmenté de 7 % (Fig. 1.11). En 2001, l'incidence était de 6,3 cas pour 100 000 personnes de nationalité française et de 57,4 cas pour 100 000 personnes de nationalité étrangère.

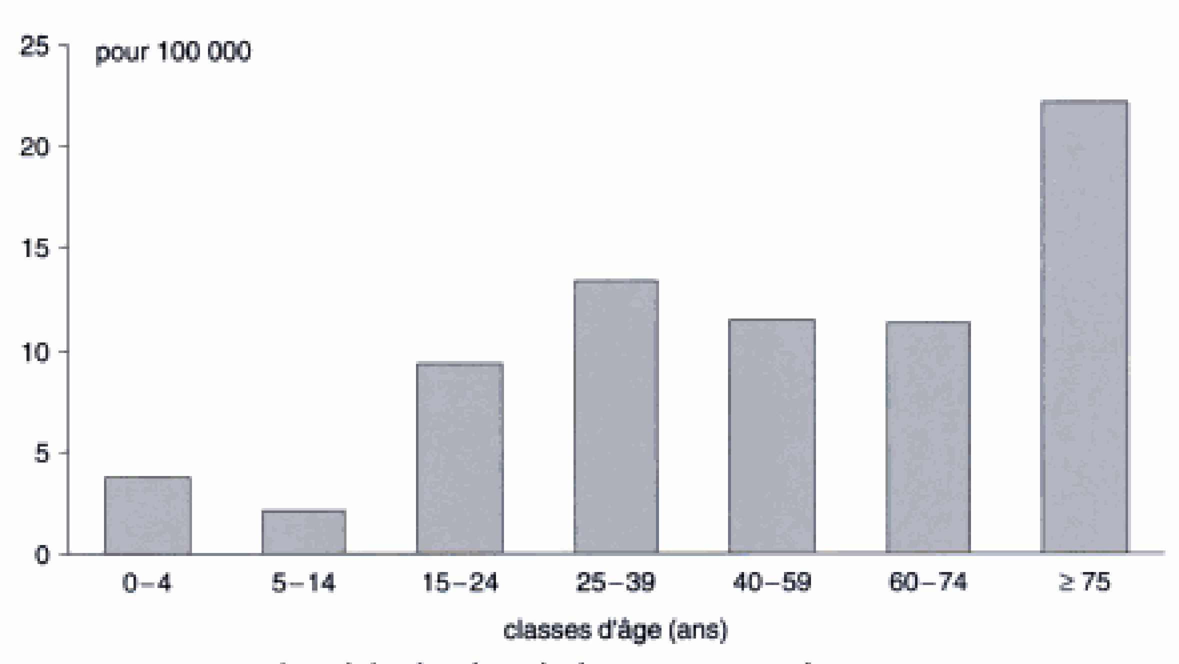


Figure 1.9. Incidence de la tuberculose selon l'âge (France métropolitaine, 2001).

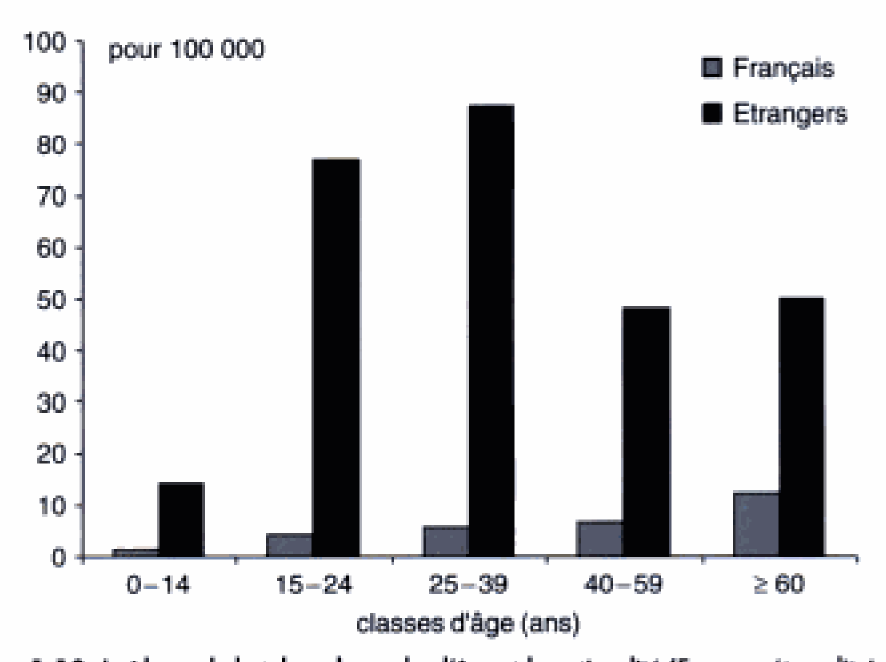


Figure 1.10. Incidence de la tuberculose selon l'âge et la nationalité (France métropolitaine, 2001).

Le pays de naissance est un meilleur indicateur de la provenance d'un pays d'endémie tuberculeuse que la nationalité. Le risque de développer une tuberculose varie selon la région d'origine et l'on observe des incidences particulièrement élevées chez les personnes nées en Afrique sub-saharienne (Fig. 1.12). L'incidence chez les personnes nées en France était de 5 cas pour 100 000 habitants. Cette incidence atteint 34 cas pour 100 000 personnes nées en Afrique du Nord et 130 cas pour 100 000 personnes nées en Afrique sub-saharienne.

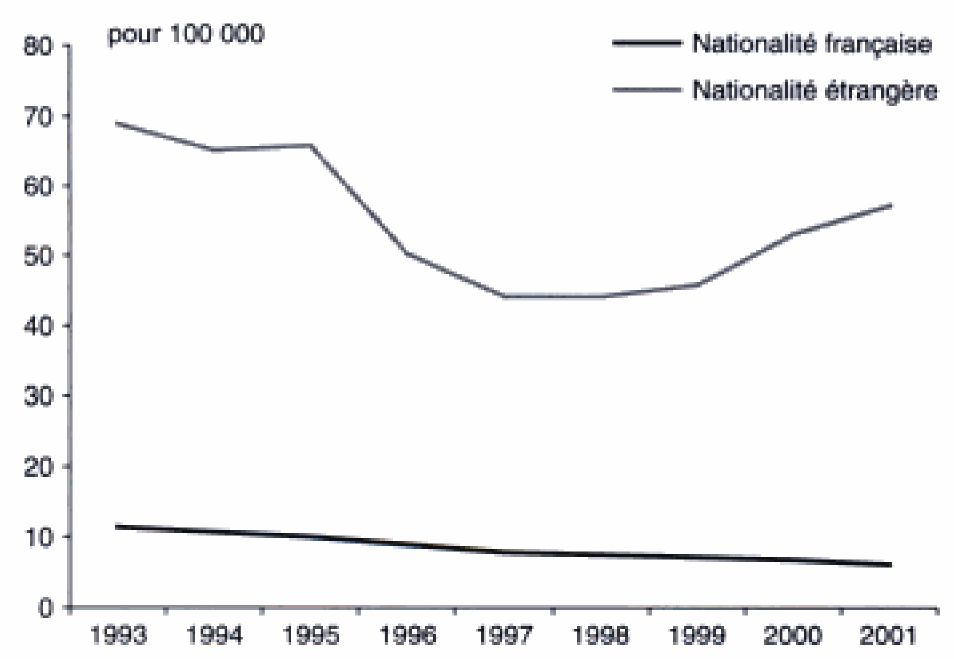


Figure 1.11. Incidence de la tuberculose selon la nationalité (France métropolitaine, 1993–2001).

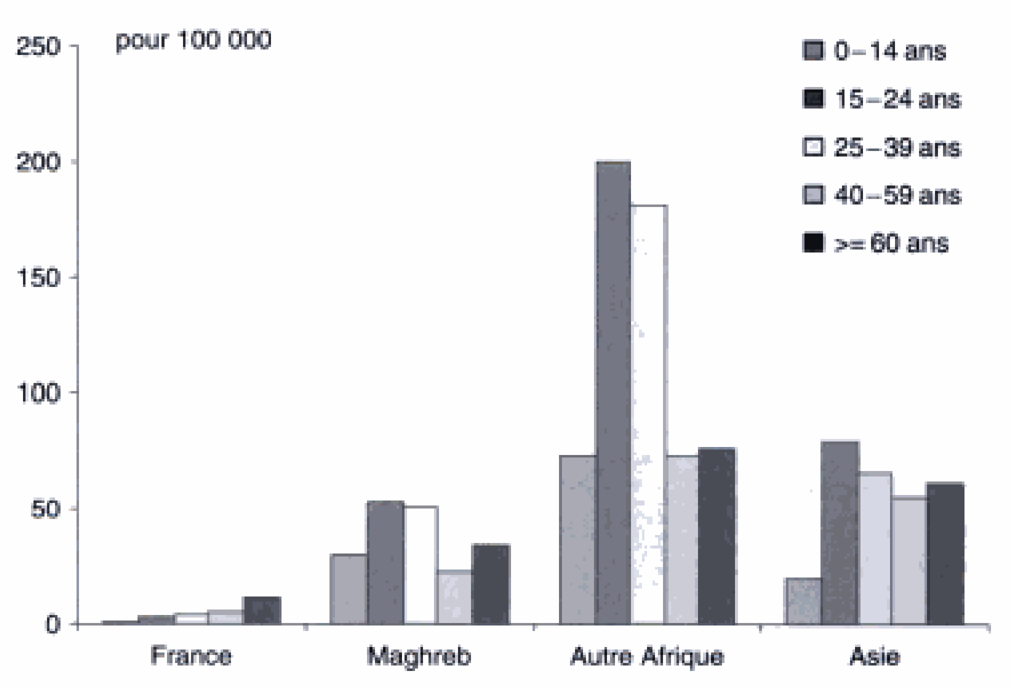


Figure 1.12. Incidence de la tuberculose selon l'âge et le pays de naissance (France métropolitaine, 2001).

Une incidence très élevée chez les étrangers est observée dans les autres pays européens. Cependant, le dénominateur utilisé dans le calcul de l'incidence chez les étrangers provient du recensement officiel, ce qui surévalue probablement l'incidence dans ce groupe.
Cette forte proportion de cas chez les migrants peut être expliquée par un contact avec le bacille tuberculeux dans leur pays d'origine qui en font des cas

latents pouvant se réactiver des années plus tard, mais une transmission récente favorisée par la précarité et la promiscuité de leurs conditions de vie ne peut être exclue. Il serait important de déterminer pour les personnes étrangères le lieu d'acquisition de leur tuberculose afin de faire la part entre infection contractée dans le pays d'origine et réactivation ou transmission récente sur leur lieu de résidence actuelle.
En effet, en 2001, 12 % des cas de tuberculose résidaient en collectivité dont 314 (40 %) chez des personnes résidant dans des foyers pour migrants ou d'hébergements de nuit. Des études récentes associant enquêtes épidémiologiques et moléculaires ont montré que la circulation du bacille tuberculeux est active dans ces foyers où se développent de véritables épidémies de tuberculose. Les personnes sans domicile fixe sont également des personnes à haut risque de tuberculose. Cette information n'était pas collectée jusqu'en 2002 au niveau national, mais le Samu social de Paris a recensé 74 cas de tuberculose chez des personnes sans domicile fixe de décembre 2000 à juin 2002 avec une incidence estimée dans cette population à 240 cas pour 100 000 personnes.

4.5. Caractéristiques cliniques et bactériologiques

La tuberculose pulmonaire isolée ou associée à une forme extrapulmonaire est la forme prédominante retrouvée dans 74 % des cas (Tableau 1.1). Les formes extrapulmonaires isolées ou associées sont retrouvées plus fréquemment chez les personnes d'origine étrangère que chez les personnes d'origine française, soit respectivement 43 % et 32 %. Depuis 1992, la proportion de méningites tuberculeuses déclarées est stable, entre 1 à 2 % de l'ensemble des cas ainsi que le nombre de cas de méningite déclarés chez des enfants de moins de 15 ans (cinq cas en moyenne par an depuis 1992).
Un traitement antérieur pour une tuberculose a été noté pour 10 % des malades de 1992 à 2000 ce qui indique que, globalement, les malades tuberculeux sont correctement pris en charge en France.
La présence de BAAR (bacilles acido-alcoolo-résistants) à l'examen microscopique dans les localisations pulmonaires, marqueur de la contagiosité de la maladie, était positif pour 62 % des cas renseignés en 2001. Le résultat de la culture parmi l'ensemble des cas était positif pour 71 % des cas renseignés.

Tableau 1.1
Localisation de la tuberculose* (France entière, 1998–2001)

	1998		2001	
	n	%	*n*	%
Extrapulmonaire	1 646	25	1 637	26
Pulmonaire isolée	4 236	64	4 064	63
Pulmonaire et extrapulmonaire	689	11	710	11
Total	6 571	100	6 411	100

*Localisation connue.

4.6. Résistance aux antituberculeux

La surveillance de la résistance aux antituberculeux est basée sur des laboratoires hospitaliers volontaires. Chez les malades non traités antérieurement, la résistance dite primaire à l'isoniazide est observée dans 3,4 % des cas, et à la rifampicine dans 0,8 % en 1999. Chez les malades déjà traités, la résistance dite secondaire à l'isoniazide est observée dans 12,3 % des cas, et à la rifampicine dans 9,4 %.
La tuberculose à bacilles résistants à la fois à l'isoniazide et à la rifampicine dits bacilles multirésistants (MDR) est surveillée depuis 1992 par le CNR de la résistance des mycobactéries aux antituberculeux en collaboration avec le CNR des mycobactéries à travers 350 laboratoires qui assurent la recherche de mycobactéries. La multirésistance est la conséquence d'un traitement insuffisant, irrégulier ou inadapté. Depuis le début de la surveillance, moins de 50 cas sont répertoriés chaque année (Tableau 1.2). En 1998, la proportion des souches MDR était de 0,6 %, stable depuis 1992. Néanmoins, chaque année, des malades MDR déjà connus sont signalés au CNR. Par exemple, sur les 39 cas notifiés en 1998, huit étaient déjà connus les années précédentes. Ceci suggère qu'une partie des tuberculoses multirésistantes ne sont pas traitées efficacement ou sont difficiles à traiter. Or ces malades sont une source persistante de dissémination de bacilles multirésistants.

4.7. Mortalité

Les tendances observées sur les cas déclarés se reflètent également sur la mortalité (Fig. 1.13). Le nombre de décès diminue en moyenne de 7 % par an de 1971 (3 666 décès) à 1992 (816 décès). En 1993, une augmentation du nombre de décès de +13 % a été observée par rapport à l'année précédente. Ce pic n'a pas perduré et le nombre de décès a continué de diminuer après

Tableau 1.2
Déclarations de tuberculoses à bacilles multirésistants de 1992 à 1998 (source : CNR de la résistance des mycobactéries aux antituberculeux)

		Nombre de cas signalés la première fois en						
Année	N	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998
1992	48	48						
1993	40	7	33					
1994	58	8	6	44				
1995	40	3	7	4	26			
1996	29	1	0	3	3	22		
1997	26	2	1	1	0	4	18	
1998	39	1	0	2	1	1	3	31

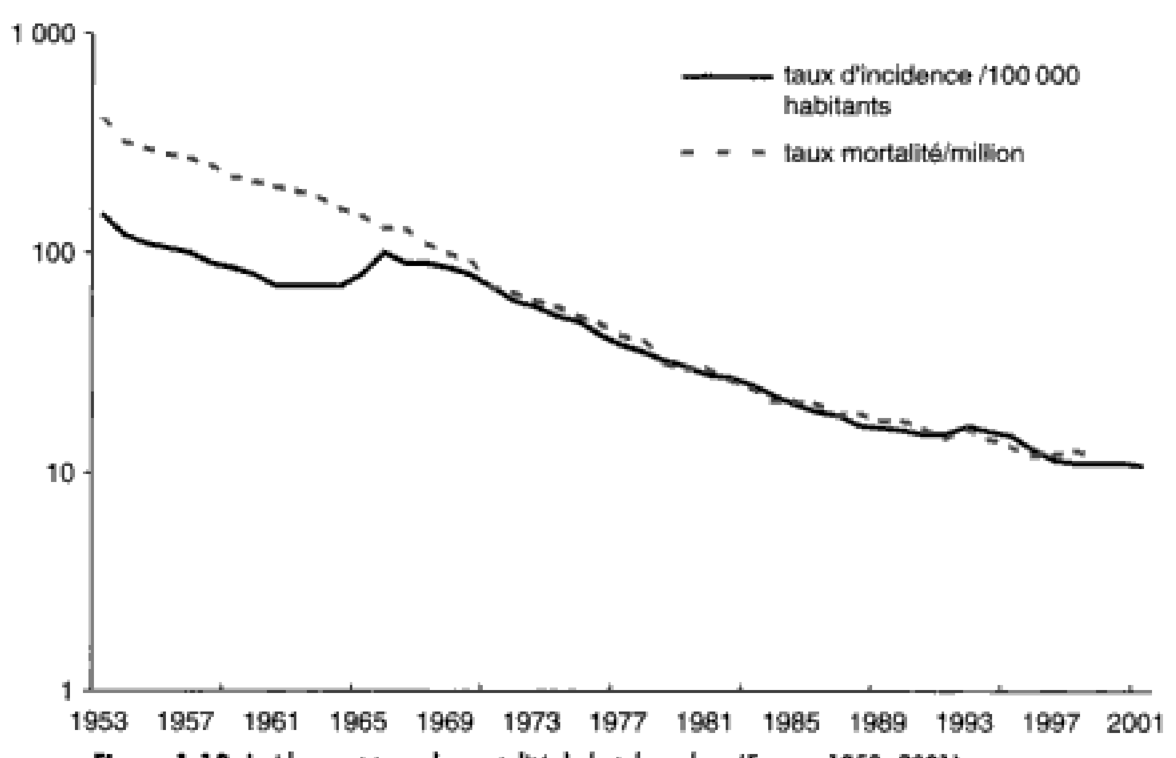


Figure 1.13. Incidence et taux de mortalité de la tuberculose (France, 1953–2001).

1994. En 1999, 695 décès par tuberculose ont été enregistrés en cause principale (Source : Inserm-Cépi DC), soit 11,9 décès par million d'habitants.

5. Conclusion

L'évolution de l'épidémiologie de la tuberculose en France et plus particulièrement en Île-de-France implique une adaptation de notre système de soins et de santé publique aux besoins de la population touchée. Le contrôle et la prévention de la tuberculose doivent être renforcés en ciblant plus particulièrement les personnes provenant de pays endémiques et celles en situation de précarité. Tous les contacts d'un cas devraient être identifiés et traités s'ils sont infectés. Dans les populations à haut risque, un dépistage ciblé avec recherche active de cas doit être réalisé. Des actions spécifiques de terrain adaptées culturellement et socialement aux besoins, associées à des moyens ciblés, doivent être développées entre les cliniciens soignant, les malades et les institutions en charge de la lutte antituberculeuse afin d'inverser les tendances épidémiologiques actuelles.

Pour en savoir plus

Bulletin épidémiologique hebdomadaire 2002. Numéro spécial sur la tuberculose N° 16-17 : 65-73.

Murray JF. La tuberculose dans le monde : situation et perspective en l'an 2000. Rev Mal Resp 2001 ; 18 : 479-84.

Dye C, Scheele S, Dolin P et al. Global burden of tuberculosis. Estimated incidence, prevalence and mortality by country. JAMA 1999 ; 282 : 677-86.

Infuso A, Antoine D, Barboza P, EuroTB. Surveillance européenne de la tuberculose en 1999 et tendances récentes. BEH 2001 ; 16-17 : 66-7.

CDC. Progress toward tuberculosis elimination in low-incidence areas of the United States. Recommendations of the advisory council for the elimination of tuberculosis. MMWR 2002 ; 51 : RR-5.

Brudney K, Dobkin J. Resurgent tuberculosis in New York City. Human immunodeficiency virus, homelessness and the decline of tuberculosis control programs. Am Rev Respir Dis 1991 ; 144 : 745-9.

Tocque K, Doherty MJ, Bellis MA, Spence DP, Williams CS, Davies PD. Tuberculosis notifications in England : the relative effects of deprivation and immigration. Int J Tuberc Lung Dis 1998 ; 2(3) : 213-8.

Moss AR, Hahn JA, Tulsky JP, et al. Tuberculosis in the homeless. Am J Respir Care Med 2000 ; 162 : 460-4.

Lillebaek T, Andersen A, Bauer J, et al. Risk of *Mycobacterium tuberculosis* transmission in a low-incidence country due to immigration from high-incidence areas. J Clin Microbiol 2001 ; 39 : 855-61.

Beckurst C, Evans S, MacFarlane AF, Packe GE. Factors influencing the distribution of tuberculosis cases in an inner London borough. Commun Dis Public Health 2000 : 3 : 28-31.

Borgdorff MW, Behr MA, Nagelkerke NJ, et al. Transmission of tuberculosis and its association with immigration and ethnicity. Int J Tuberc Lung Dis 2000 ; 4 : 287-94.

Robert J, Trystram D, Truffot-Pernot C, Jarlier V. Surveillance de la tuberculose à bacilles multirésistants en France en 1998. BEH 2001 ; 16-7 : 71-2.

Flament-Saillour M, Robert J, Jarlier J, Grosset J. Outcome of multi-drug resistant tuberculosis in France : a nationwide case-control study. Am J Respir Crit Care Med 1999 ; 160 : 587 : 93.

Chapitre 2

Physiopathologie et immunité de l'infection tuberculeuse

Philippe-Henri Lagrange, Alain Wargnier, Jean-Louis Hermann

Mycobacterium tuberculosis demeure l'un des agents microbiens pathogènes responsable d'une morbidité et d'une mortalité impressionnante plus d'un siècle après sa découverte, cela malgré les avancées importantes qui ont été réalisées dans les domaines du diagnostic biologique, de la couverture vaccinale par le BCG et de l'efficacité des chimiothérapies courtes pour la prévention et le traitement de la tuberculose.
La diminution régulière des déclarations ou notifications des cas de tuberculose pulmonaire dans les pays industrialisés, qui était le résultat des mesures efficaces mises en place pour lutter contre la maladie, avait entraîné, il y a quelques années, l'espoir d'une possible éradication de la maladie dans ces pays. Mais cette vision optimiste a dû être corrigée devant l'augmentation réelle, ces dernières années, du nombre de nouveaux cas chez l'adulte et chez l'enfant.
Un des problèmes majeurs concernant la tuberculose est qu'il s'agit d'une maladie granulomateuse chronique dont le développement et l'évolution sont variables selon les individus. Elle est soit asymptomatique d'évolution simple et bénigne (dans 90 % des cas), soit au contraire elle peut être compliquée d'emblée (5 %) ou à plus long terme (5 %). Ces différentes évolutions sont fonction de l'efficience et de la permanence des mécanismes de défense innés et acquis qui sont mis en place en réponse à l'infection et aux ré-infections successives.
Cependant, aucune donnée scientifique satisfaisante n'a jusqu'à présent permis d'expliquer, au niveau cellulaire et moléculaire, la fragilité particulière des individus dont l'infection évolue d'un seul tenant vers la maladie. De même, aucun marqueur cellulaire ou humoral ne permet actuellement de définir et reconnaître la résistance acquise d'un individu après l'infection tuberculeuse. Tout au plus peut-on reconnaître l'existence d'un contact infectant. Par ailleurs, il a été démontré que l'origine et l'importance des lésions tissulaires granulomateuses locorégionales sont directement corrélées à la réponse immunopathologique de l'hôte.
Enfin, les études épidémiologiques ont permis, non pas de définir la susceptibilité individuelle au développement de la tuberculose maladie, mais de regrouper certains facteurs qui définissent les groupes à risque, pour un développement de la maladie rapidement après la primo-infection, ou pour une réactivation tardive. Parmi les groupes de sujets dits à risques de développer une forme compliquée de primo-infection, ou d'évoluer rapidement vers la tuberculose maladie, les enfants (âge ≤ 4 ans) et les adolescents (12–15 ans) représentent un groupe de fragilité particulière. C'est dans ces groupes que s'observent généralement les formes disséminées de la maladie (miliaire, méningite tuberculeuse, atteintes lymphatiques). Ainsi, la survenue d'une tuberculose chez l'enfant représente un marqueur épidémiologique important permettant d'apprécier le degré de la transmission de *M. tuberculosis* au sein d'une population donnée.
Les connaissances immunologiques concernant la physiopathologie, les mécanismes de la guérison et ceux de la protection au cours de la tuberculose humaine ne sont que partielles. Ces connaissances sont en grande majorité issues des modèles expérimentaux de laboratoire (souris, cobayes, lapins). Une minorité d'entre elles ont été confirmées chez l'homme, en particulier chez l'adulte. Cette courte revue concernera en premier lieu l'histoire naturelle de

la tuberculose chez l'homme, puis les connaissances actuelles de sa physiopathologie cellulaire et moléculaire, des réponses immunologiques de l'hôte vis-à-vis de *M. tuberculosis*, issues des modèles animaux, les preuves obtenues chez l'homme adulte et l'analyse des résultats faisant état des facteurs génétiques de susceptibilité des individus atteints.

1. Histoire naturelle de la tuberculose. Définitions

L'histoire naturelle de la maladie tuberculeuse passe par trois étapes : la contamination, la tuberculose infection, la tuberculose maladie. La connaissance précise de ces étapes successives constitue un guide indispensable pour l'approche diagnostique, la prévention performante à l'échelle individuelle, mais aussi pour la prise en charge épidémiologique correcte du problème sociétal.

Il faut d'emblée séparer les évènements survenant chez les patients immunocompétents de ceux survenant chez les patients immunodéprimés.

1.1. Chez les patients immunocompétents

La transmission du bacille tuberculeux (*M. tuberculosis* ou bacille de Koch-BK) (Fig. 2.1) se fait par voie aérienne par les micro-gouttelettes de Pflügge, émises par un patient atteint de tuberculose pulmonaire excavée dont l'expectoration contient des BK à l'examen microscopique. Le risque est d'autant plus grand que le patient contagieux tousse et crache. Le nombre minimal de bacilles vivants capables d'entraîner une infection n'est pas connu avec précision. On l'estime à un minimum de 100 bacilles. Cependant, la fourchette peut être très large et pourrait dépendre des capacités de la défense innée des individus et de la « virulence » des souches. La limite inférieure de détection de l'examen microscopique est de 10 000 bacilles. On peut donc concevoir que les patients ayant un examen microscopique négatif puissent également être contagieux. En fait, les données citées sur la transmissibilité reposent surtout sur les données de fréquence d'infection et de maladie autour d'un cas de tuberculose active, à expectoration positive.

L'infection, aussi dénommée primo-infection tuberculeuse ou tuberculose infection (seul ce dernier terme sera utilisé), se manifeste par le développement d'une réponse immunologique plus ou moins intense vis-à-vis du BK selon les individus, la souche et la dose infectante. Cette réponse immunologique est mise en évidence, depuis une centaine d'années, par la réaction cutanée à la tuberculine, laquelle traduit une réaction d'hypersensibilité de type retardée (HSR) à médiation cellulaire vis-à-vis d'antigènes mycobactériens.

L'intensité de cette réaction est variable. Elle n'exprime pas un état de protection acquis post-infectieux, même si HSR et immunité anti-mycobactérienne peuvent évoluer en parallèle. La tuberculose infection est dans la grande majorité des cas asymptomatique et n'est diagnostiquée qu'en présence d'une positivité récente de l'HSR à la tuberculine (on admet sa positivité pour une valeur dépassant les 10 mm par rapport à une valeur précédente). Ce test est ainsi utilisé comme le témoin de la transmission bacillaire dans une population naïve. Il évalue ainsi le risque annuel d'infection tuberculeuse. Dans les

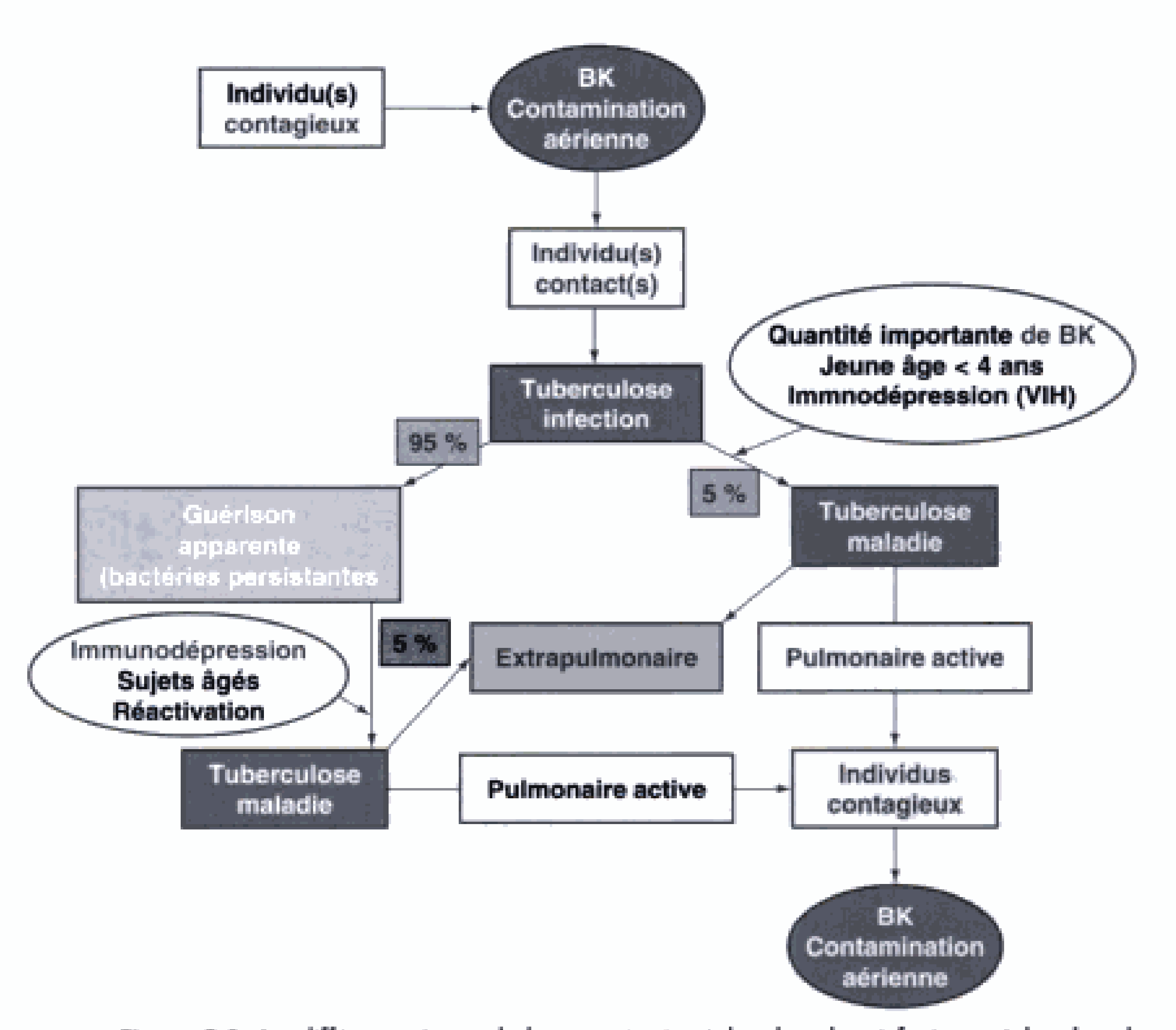


Figure 2.1. Les différentes étapes de la contamination à la tuberculose infection et à la tuberculose maladie et les facteurs associés participant à l'évolution de ces différentes étapes.

programmes de lutte contre la tuberculose, ce test permet d'évaluer l'efficacité des mesures prises pour diminuer les contaminations. Marqueur de la tuberculose infection, il est aussi un indicateur individuel pour décider d'une chimiothérapie préventive instituée dans le but d'éviter le passage à l'étape ultérieure qui est la tuberculose maladie.

La majorité des individus infectés (90 %), en France et dans les pays industrialisés, sont immuns et ne développeront pas de tuberculose maladie au cours de leur vie en dépit de la présence de bactéries vivantes persistantes, appelées aussi « dormantes » et de possibles ré-infections. Il s'agit d'un état d'équilibre en faveur de l'hôte et donc d'une guérison apparente après l'infection. Cet équilibre n'est pas définitif et peut être rompu en cas d'altération du système immunitaire, aboutissant à ce que l'on appelle une réactivation. Les mécanismes de l'altération du système immunitaire peuvent être soit induits par une thérapeutique immunosuppressive (corticoïdes, anti-TNFα...), soit

constitutifs liés à une pathologie acquise (silicose, diabète, VIH). La tuberculose entre alors dans le cadre nosologique d'une pathologie opportuniste.
La tuberculose maladie est appelée communément la tuberculose. En fonction des circonstances, citées dans le paragraphe précédent, mais aussi en fonction d'un certain nombre de facteurs présents au moment de l'infection, la tuberculose infection peut évoluer d'un trait vers la tuberculose maladie. Les facteurs individuels de l'hôte, comme le jeune âge, la quantité de bacilles transmis et la fréquence de la contagion sont souvent cités comme associés à cette évolution dans un espace-temps qui peut aller de quelques semaines à quelques mois.
Les manifestations cliniques et radiologiques qui apparaissent définissent la tuberculose maladie. Ce passage à la tuberculose maladie se produit pour environ 10 % des patients après leur tuberculose infection, 5 % préférentiellement dans les deux ans qui suivent la tuberculose infection et 5 % ultérieurement. Cette apparition tardive est appelée « réactivation », la tuberculose maladie survenant à distance de la tuberculose infection.
Cependant, il est reconnu depuis quelques années que nombre de ces tuberculoses maladies sont aussi dues à des ré-infections. Si ces démonstrations ont surtout été faites dans des populations de personnes co-infectées par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), elles surviennent aussi dans des populations indemnes du VIH, principalement dans des régions à forte endémie tuberculeuse.
Sans traitement, la tuberculose maladie évolue, soit vers la mort (50 %), soit vers la guérison spontanée (25 %), soit vers la chronicité pérennisant le risque de contagion. Un traitement efficace, bien conduit et prescrit à temps, est associé à un taux de guérison voisin de 100 %.

1.2. Chez le patient immunodéprimé (et ce quelle qu'en soit la cause)

Le risque de développer une tuberculose maladie après la tuberculose infection, ou après une guérison apparente de plusieurs années, s'accroît considérablement chez les personnes au système immunitaire altéré. Il a été calculé qu'en cas de co-infection par le VIH, ce risque est multiplié de 50 à 300 fois. Par exemple, l'incidence de la tuberculose maladie chez les patients VIH-positifs peut atteindre 50 à 60 % des patients tuberculeux en Afrique subsaharienne.
Par ailleurs, la rapidité de la stérilisation sous traitement est inversement proportionnelle au degré d'immunodépression. Ceci est illustré par les résultats observés depuis l'utilisation des traitements antirétroviraux, en particulier les trithérapies, qui ont réduit de façon drastique (80 %) le nombre de cas de tuberculose maladie chez les patients VIH-positifs à haut risque, une monothérapie antirétrovirale réduisant ce risque de 40 %.
Enfin, ces patients tuberculeux, co-infectés par le VIH, ont une fréquence de réaction appelée paradoxale qui peut atteindre 30 %. Ces réactions paradoxales sont le témoin d'une récupération des mécanismes immunologiques, en particulier immunopathologiques, non régulés, en présence d'une concentration élevée d'antigènes mycobactériens tissulaires.

2. Physiopathologie de la tuberculose

2.1. Éléments descriptifs

L'élément histologique fondateur de la tuberculose est la constitution de tubercules plus ou moins importants en volume, observés dans les tissus atteints (Fig. 2.2, voir atlas couleurs page 291). Tous les organes peuvent être touchés, mais l'atteinte pulmonaire est la plus fréquente chez les individus tuberculeux immunocompétents. Les tubercules, initialement observés, correspondent à des granulomes inflammatoires chroniques. Ils sont de taille variable, allant du grain de millet (TB milliaire) à plusieurs centimètres de diamètre.

Dans la tuberculose, le centre du granulome est souvent occupé par une nécrose caséeuse, qui donne à cette maladie un signe distinctif, le granulome avec caséification.

Dans le cas de la tuberculose pulmonaire, ces granulomes évoluant vers la caséification, la nécrose et la formation de caverne font que le contenu peut être évacué par une bronche. En cas de volume plus faible et d'évolution immunitaire favorable, le granulome primaire évolue vers la calcification. Il est alors visible aisément sur la radiographie du thorax et est appelé « complexe de Ghon » en association avec la calcification du ganglion drainant le complexe primaire.

2.2. Organisation cellulaire

2.2.1. Granulome

Les granulomes tuberculeux présentent une organisation cellulaire typique des granulomes inflammatoires chroniques. Ils consistent en un afflux majeur de cellules mononucléées disposées en couronnes successives (Fig. 2.3A, voir atlas couleurs page 292). Au centre, on observe une accumulation de macrophages, plus ou moins activés et nécrosés, voire apoptotiques, contenant des bacilles alcoolo-acido-résistants (BAAR) (Fig. 2.3B, voir atlas couleurs page 292), entourés d'amas de cellules épithélioïdes. Sur les berges de ces amas, et quelquefois en leur centre, on observe des cellules géantes multinucléées, dites cellules de Langerhans, formées à partir de la fusion de macrophages ou après division nucléaire sans cytodiérèse. La couronne périphérique adjacente est constituée de fibroblastes globuleux et de cellules mononucléées.

Des marquages immunohistochimiques (Fig. 2.3C, 2.3D, 2.3E, voir atlas couleurs page 292) ont permis de démontrer d'une part la présence des cellules dendritiques et d'autre part de lymphocytes T de types $CD4^+$ et CD8, ces derniers ayant une situation plus dispersée (et excentrée). Par ailleurs, des lymphocytes B et des cellules plasmocytaires sont observées au sein de cette couronne périphérique. Aucun œdème n'est observé, mais au contraire des dépôts de fibrine et de collagène constituent le fond acellulaire de ces granulomes.

2.2.2. Formation du granulome

La constitution et l'évolution de ces granulomes sont sous la dépendance de la réponse immunitaire innée et acquise de l'hôte ainsi que de la composition moléculaire pariétale des souches infectantes. Une réponse inflammatoire

d'évolution favorable car stérilisante nécessite une coordination précise et rigoureuse des éléments de la réponse immunologique. La première étape requiert le recrutement coordonné des cellules sanguines mononucléées dans la proximité du foyer mycobactérien. Cette accumulation préférentielle des cellules monocytaires est liée à leur perception de signaux (par l'intermédiaire de chimiokines) leur permettant d'une part d'adhérer aux capillaires et d'autre part de migrer vers le foyer. Cette étape est contrôlée par des molécules d'adhésion et des chimiokines. Les premières, comme la molécule intracellulaire d'adhésion-1 (ICAM-1), sont nécessaires pour la formation des granulomes. En effet, des souris produisant une molécule ICAM-1 tronquée, non fonctionnelle, n'ont pas de granulome après l'infection tuberculeuse. Les chimiokines contribuent à la migration cellulaire et à leur localisation, mais aussi à l'activation et à la différenciation des lymphocytes T in situ. Ces molécules, produites de façon sélective dans l'infection tuberculeuse, ont été étudiées surtout dans le modèle murin. Il a été ainsi démontré la présence de RANTES, MIP1-α, MIP2, MCP2, MCP3, MCP5, et IP10. Ces différentes molécules sont produites par les macrophages infectés. Des molécules similaires (RANTES, MCP1, MIP1 et IL8) sont produites par les macrophages alvéolaires humains infectés par *M. tuberculosis* dans des modèles in vitro. Par ailleurs, ces chimiokines nécessitent la présence de récepteurs à la surface des cellules cibles, les macrophages et les cellules T, notamment les récepteurs de types CCR5, CCR2 et CCR1.

2.3. Mécanismes moléculaires

Les différentes étapes décrites ci-dessus représentent un ensemble coordonné d'évènements dont les premiers sont induits par le contact entre les bactéries inhalées et les cellules phagocytaires alvéolaires. Les premières cellules impliquées sont les macrophages alvéolaires et les monocytes recrutés localement. Les secondes cellules seront les cellules dendritiques qui feront le lien avec les réponses immunitaires adaptatives après migration dans le ganglion lymphatique drainant, entraînant une réponse immune spécifique, plus ou moins adaptée. Il existe ainsi un lien très fort entre les mécanismes cellulaires et moléculaires des réponses innées et ceux des réponses acquises.

2.3.1. Macrophages

2.3.1.1. Activation des macrophages

Lorsque les mycobactéries parviennent au sein de l'alvéole pulmonaire, elles sont reconnues par les différents récepteurs présents à la surface des macrophages alvéolaires. Cette reconnaissance entraîne deux phénomènes concomitants : la phagocytose des mycobactéries et l'activation des macrophages (Fig. 2.4). Une grande partie de l'inoculum bactérien sera alors rapidement détruit, mais une minorité va résister et pouvoir dans un second temps se multiplier. Cette multiplication peut aboutir, en fonction du nombre initial de bactéries infectantes et de la « virulence » des souches, à la destruction des macrophages et au relargage des bactéries. Celles-ci seront alors ingérées secondairement, soit par les cellules nouvellement recrutées (macrophages et cellules dendritiques), soit par des cellules non phagocytaires comme les pneumocytes.

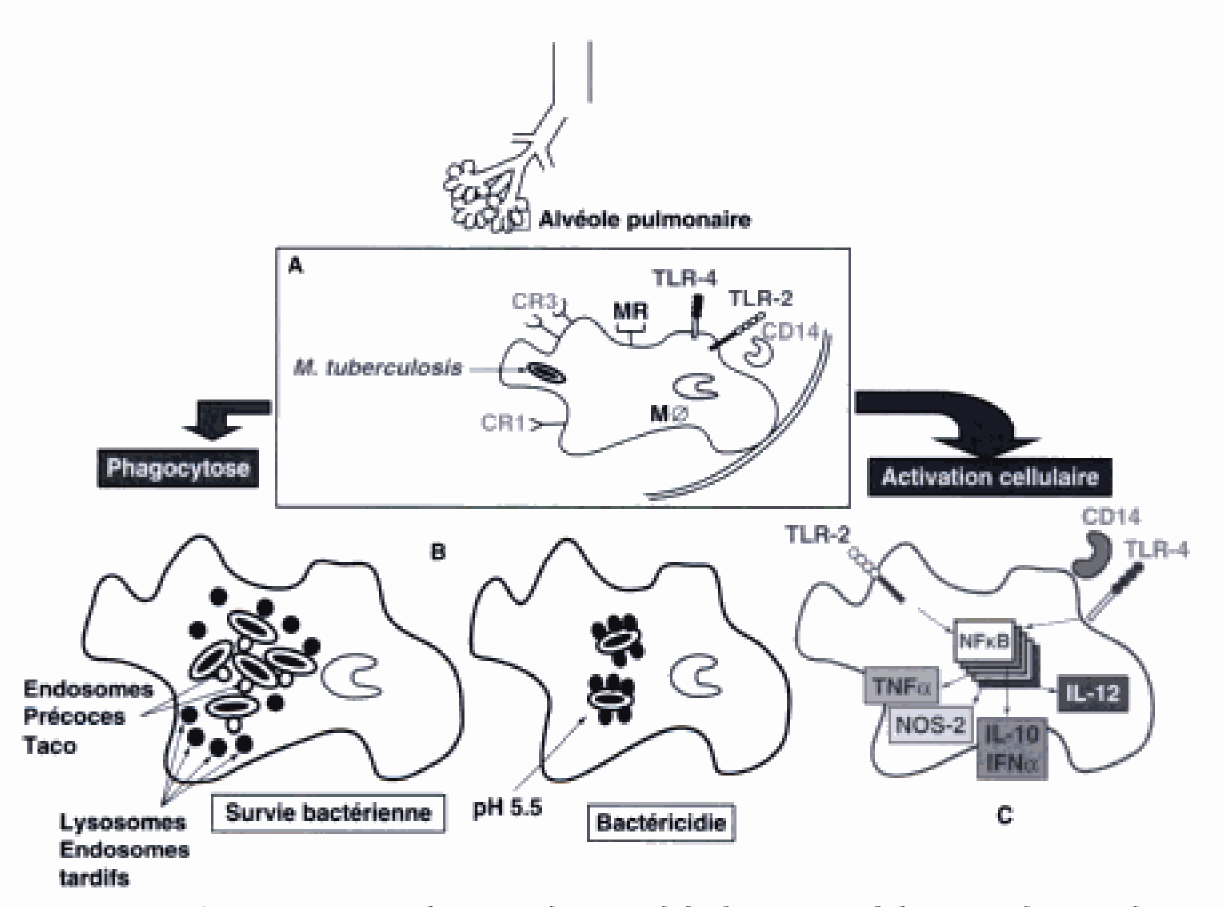


Figure 2.4. Représentation schématique des étapes de la phagocytose et de l'activation des macrophages alvéolaires. **A.** Macrophage alvéolaire avec ces différents récepteurs impliqués dans la phagocytose et l'activation des macrophages. **B.** Phagocytose des mycobactéries et des deux voies de survie bactérienne et de bactéricidie. **C.** Activation cellulaire par l'intermédiaire des récepteurs de surface et de l'activation de différents gènes utilisant la voie NF-κB.

L'internalisation des mycobactéries par les macrophages alvéolaires est facilitée par deux types de récepteurs : les récepteurs du complément, en particulier CR1, CR3 et CR4, et le récepteur au mannose (MR). Il semble que ce dernier joue un rôle majeur dans la liaison et l'internalisation des espèces pathogènes, contrairement aux récepteurs pour le complément.
Conjointement à cette internalisation, d'autres récepteurs vont induire l'activation des macrophages. Ces nouveaux récepteurs ont été mis en évidence ces dernières années et font l'objet de nombreuses recherches. Il s'agit des *Toll-like receptors* (TLR) et du CD14, ce dernier n'ayant pas de rôle direct dans l'activation mais a un rôle dans la liaison membranaire. Les deux récepteurs essentiels pour l'activation cellulaire sont donc le TLR2 et le TLR4.
Les études moléculaires ont montré que le signal transduit après liaison aux TLR n'était pas équivalent pour chacun d'entre eux. Néanmoins, des voies communes d'activation de gènes impliquant la molécule NF-kB sont utilisées. Les bactéries entières vivantes sont capables d'activer les macrophages. Cependant, certaines structures moléculaires (appelées aussi agonistes) des mycobactéries sont capables de se lier aux TLR et d'induire l'activation. Mais

cette liaison est spécifique suivant les récepteurs concernés (Fig. 2.5). Ainsi, les agonistes communs pour TLR4 et TLR2 sont représentés par la bactérie entière vivante.
L'activation via le TLR2 est obtenue avec des mycobactéries inactivées par la chaleur, par le LAM des mycobactéries à croissance rapide (Ara-LAM), la lipoprotéine de 19 kDa, et un facteur soluble thermorésistant sécrété (STF), d'un poids moléculaire de 6 kDa, associé au phosphatidylinositol mannoside (PIM).
L'activation via le TLR4, est liée à la présence de bactéries vivantes et à un facteur thermosensible associé à la paroi mycobactérienne (CAF). Il est intéressant de noter que les LAM de *M. tuberculosis*, ou du BCG, capés par les résidus mannose, sont incapables d'induire l'activation via les TLR2 et TLR4. Il est ainsi possible que d'autres récepteurs interviennent, non encore mis en évidence. Il a par ailleurs été démontré que le récepteur CD14 intervenait

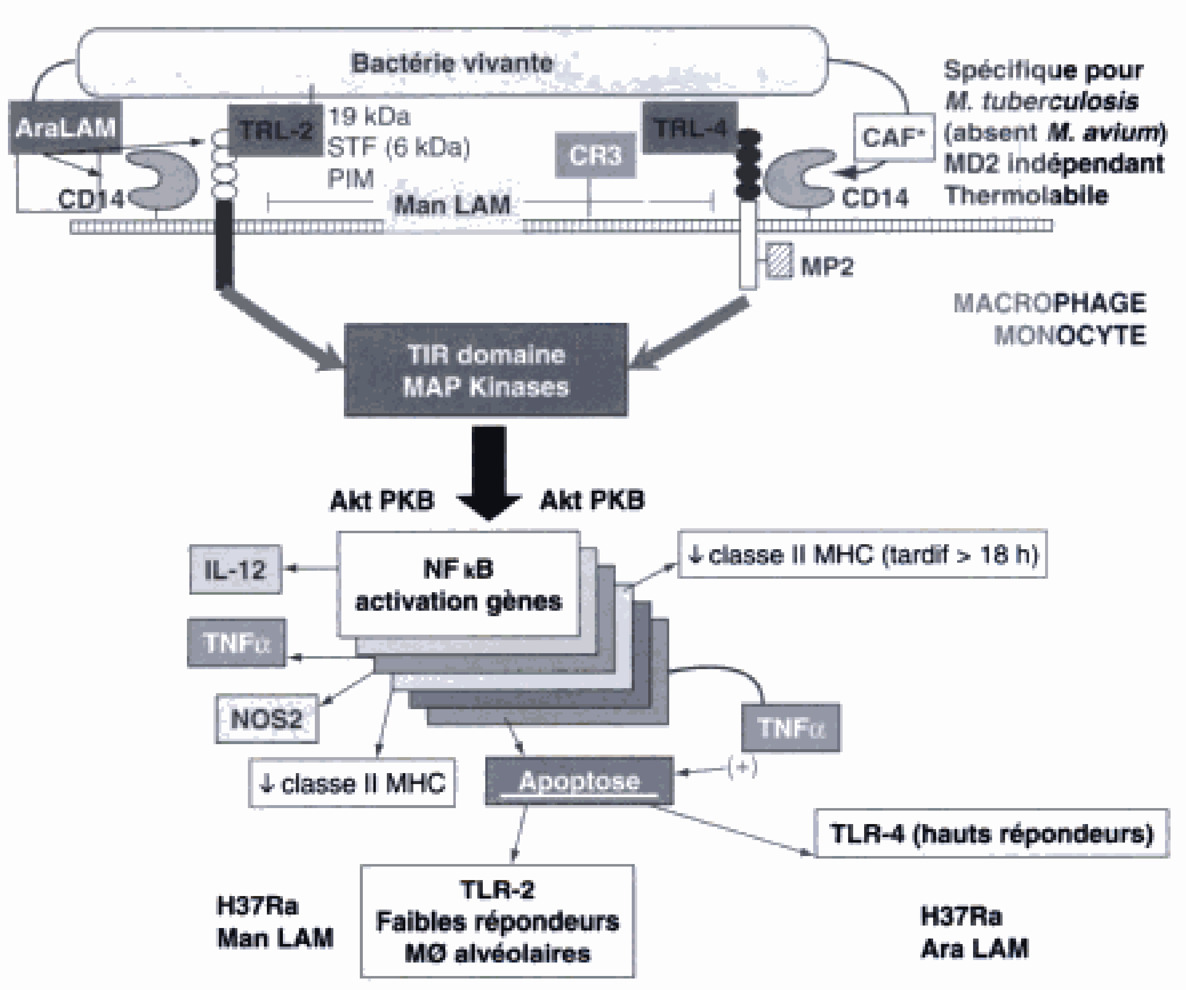


Figure 2.5. Diagramme schématique montrant les différentes voies d'activation des macrophages et monocytes par l'intermédiaire des récepteurs de surface des cellules et les différents substrats agonistes de l'activation cellulaire. Les flèches indiquent l'activation cellulaire aboutissant à l'activation en cascade de la voie NF-κB et l'activation de différents gènes avec la représentation de leurs produits. Il est signalé la possible activation de la voie de l'apoptose cellulaire en fonction des récepteurs impliqués. Les traits en T indiquent un effet inhibiteur sur l'activation cellulaire des molécules de Man-LAM.

aussi, en particulier en augmentant l'activation cellulaire par la lipoprotéine de 19 kDa.

Les différentes étapes de ce système d'activation complexe ne sont pas entièrement connues. Seuls sont connus les produits des différents gènes activés et les conséquences physiopathologiques de l'activation qu'ils produisent.

L'activation, via le TLR2, induit la production de deux cytokines majeures, le TNFα et l'interleukine 12 (IL12) et l'activation du gène de la NO synthase-2 (NOS2). Cette dernière est renforcée par le TNFα et entraîne la production des dérivés nitrés toxiques pour les mycobactéries. Cette première voie de bactéricidie des mycobactéries est complétée par l'induction d'une mort cellulaire programmée (apoptose) des macrophages infectés. Elle est induite via les TLR2 et TLR4, mais seule celle induite via le TLR4 est renforcée par la présence de TNFα. Les mycobactéries présentes au sein des cellules apoptotiques seront relarguées dans le milieu extracellulaire. La survenue de cette apoptose est variable en fonction de l'environnement tissulaire des macrophages. Ainsi, les macrophages alvéolaires sont de faibles répondeurs à l'apoptose induite via le TLR2.

Les mycobactéries survivantes seront prises en charge par les cellules phagocytaires (monocytes et cellules dendritiques) recrutées au site initial de l'inflammation. Ce recrutement est également sous la dépendance des concentrations locales de cytokines (TNFα, IL12) et de chimiokines (Fig. 2.6, voir atlas couleurs page 293). Cependant, la cytokine majeure capable, d'une part de jouer un rôle dans le recrutement et, d'autre part, dans l'activation des monocytes sanguins, est l'interféron gamma (IFNγ), celui-ci étant produit majoritairement par les cellules T et les cellules NK. Seules ces dernières ont la capacité de produire l'IFNγ dans les premiers jours post-infection, sans la nécessité d'une reconnaissance antigénique comme cela sera le cas ultérieurement pour les lymphocytes T. Cette production précoce d'IFN-γ par les cellules NK est très fortement augmentée lorsque ces cellules sont dans un environnement contenant de l'IL12 et du TNFα en concentration suffisante. Le gradient de concentration de l'IFNγ induit le recrutement des monocytes sanguins, en association avec le MIF (*migrating inhibitory factor*) et le TNFα, par l'intermédiaire de leurs récepteurs cellulaires. Ces différentes cytokines induisent l'activation du gène de la NOS2, aboutissant à la production de dérivés nitrés toxiques et à la bactéricidie des mycobactéries phagocytées.

Cette démonstration a été parfaitement validée dans les modèles murins in vivo et sur des macrophages étudiés in vitro. Cependant, chez l'homme, des études similaires utilisant des macrophages ont montré l'incapacité totale de l'IFNγ humain à induire une bactéricidie, même en présence de TNFα. Seule la présence de cholécalciférol (25-OH vitamine D3) permettait l'induction de dérivés nitrés et de la bactéricidie. Il a été démontré depuis que le cholécalciférol était hydrolysé en calcitriol (1-25 di-hydroxy vitamine D_3) qui est un puissant activateur du gène NOS2. Ce fait peut être rapproché de l'observation faite en Angleterre, d'une fragilité et d'une sévérité plus grande des tuberculoses observées chez des individus ayant un déficit en vitamine D_3.

2.3.1.2. Phagocytose, survie et multiplication intracellulaire de *M. tuberculosis*

Malgré les différents systèmes de défense innée induits par l'hôte infecté et efficaces pour réduire, voire éliminer la majorité des mycobactéries non tuber-

culeuses, *M. tuberculosis* est capable de résister à ces mécanismes, et les différents éléments de cette résistance ont fait l'objet d'études cellulaires et moléculaires récentes, confirmant des observations anciennes.
Dans les modèles expérimentaux in vivo, comme cela est montré dans la Fig. 7, la quantité d'unités bactériennes formant colonie (*colony forming unit*, CFU) évolue en fonction du temps. Ainsi, après une infection délivrée par voie aérienne (par aérosol) avec un inoculum suffisant (10^6/souris), une diminution rapide du nombre de CFU dans les poumons est observée en quelques heures (Fig. 2.7–ligne 1). Elle est suivie d'une augmentation rapide, caractérisée par

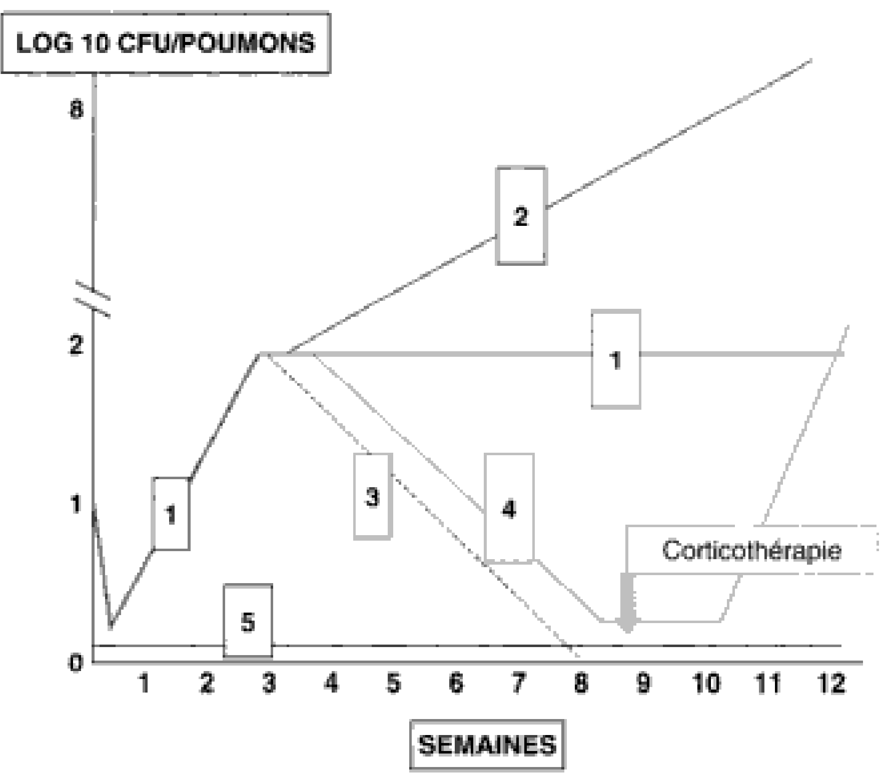


Figure 2.7. Représentation schématique des différents modes de multiplication de *M. tuberculosis* dans les poumons de différentes lignées de souris après une infection produite par aérosol. À différents temps après l'inoculation infectante, des groupes de plusieurs souris sont sacrifiés et le nombre de bactéries présentes dans les poumons est mesuré en évaluant les CFU. On constate une diminution rapide du nombre de bactéries ayant atteint les poumons qui est suivie d'une remontée des CFU avec un temps de doublement de 24 heures pendant trois semaines (ligne 1). À partir de ce temps, l'évolution est variable suivant les lignées de souris qui ont été étudiées. Pour **la ligne 1**, on observe l'arrêt de la croissance et un maintien du nombre de CFU, sous la forme d'un plateau. Cette constance du nombre de bactéries est attribuable à une réponse de type Th1, associée aux T $CD8^+$ et au TNFα. **La ligne 2** : une absence d'arrêt de la multiplication est notée après la 3e semaine correspondant à une réponse immunitaire absente ou inadéquate, comme on peut le démontrer avec des souris athymiques (souris Nude), des souris KO pour le récepteur de l'IFNγ. **La ligne 3** est représentative de l'évolution de mutants de *M. tuberculosis* auxotrophes non virulents. **La ligne 4** est représentative de la ligne 1, qui a été traitée par des antibiotiques à partir de la 3e semaine et qui a reçu des corticoïdes ultérieurement démontrant l'absence d'éradication complète des mycobactéries et la réactivation dans un modèle expérimental appelé modèle Cornell. **La ligne 5** correspond au suivi d'une infection latente induite après un faible inoculum.

un temps de doublement des bactéries proche de 24 heures. Cette phase de croissance rapide dure entre trois et quatre semaines, puis un arrêt de la croissance est observé dont l'évolution ultérieure variera suivant les lignées de souris testées.

Lorsque l'on mesure la croissance de *M. tuberculosis* en culture cellulaire, dans des macrophages murins ou humains, la courbe de croissance est similaire à celle observée in vivo (Fig. 2.8).

Après une phase de latence, dont la durée est inversement proportionnelle à l'importance de l'inoculum infectieux (exprimé par le rapport nombre de bactéries mises en présence du nombre de cellules : MOI), la croissance intracellulaire secondaire correspond à un temps de doublement bactérien de 26–28 heures. En général, les différentes publications ne montrent pas les temps d'étude plus tardifs, car la mortalité cellulaire est trop importante et les résultats observés ne sont plus interprétables. Avec les mycobactéries non pathogènes et suivant les espèces étudiées, on observe, soit une multiplication moins rapide (temps de doublement augmenté), soit une absence de multiplication avec une diminution plus ou moins rapide du nombre de CFU (Fig. 2.7–ligne 3).

Les mécanismes associés à la survie de *M. tuberculosis* dans les macrophages ont été évoqués il y a plus de trente ans suivant les observations de D'Arcy Hart. Comme signalé précédemment, la liaison initiale de H37Rv, souche virulente de *M. tuberculosis*, aux MR semblait être due à la structure particulière du lipoarabinomannanne (Man-LAM). L'observation fondamentale faite par

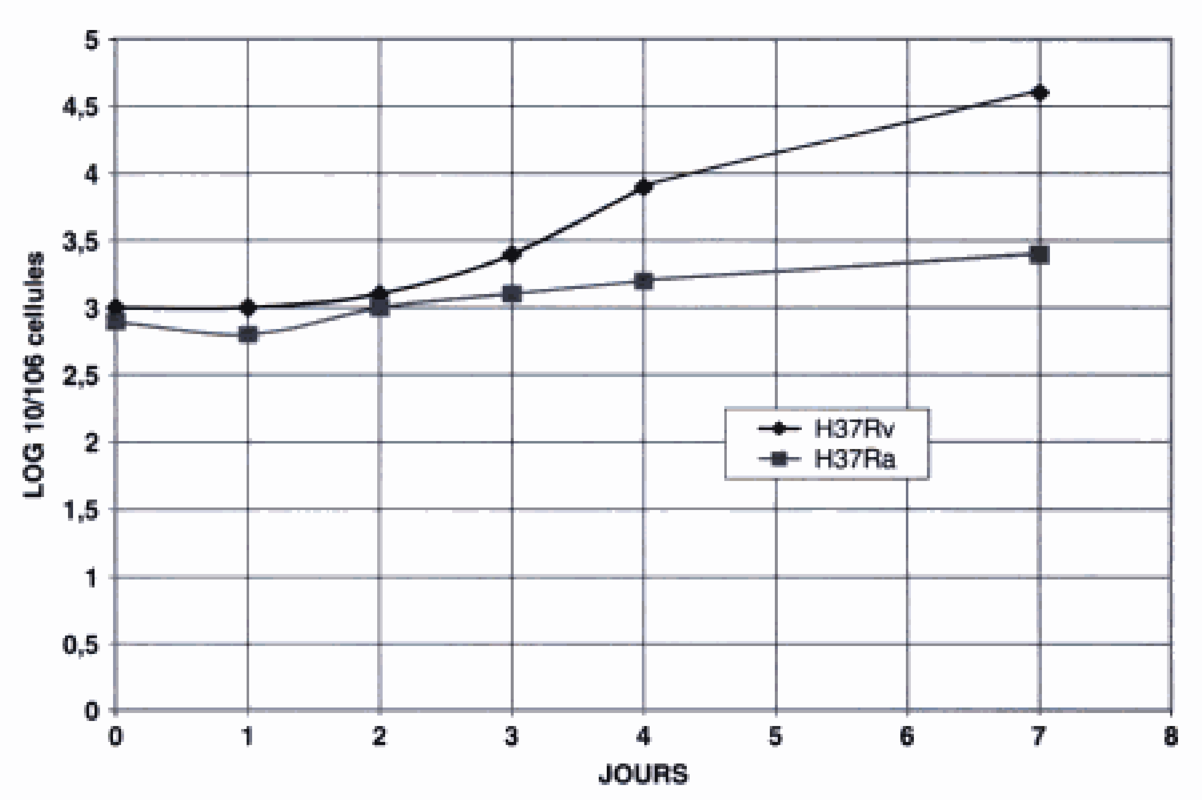


Figure 2.8. Courbes de croissance comparative mesurées par les CFU de deux souches de *M. tuberculosis* H37Rv et H37Ra cultivées in vitro dans les macrophages de souris.

D'Arcy Hart a été de montrer que la survie et la multiplication des mycobactéries au sein des macrophages étaient associées à l'absence de fusion entre les vacuoles contenant les mycobactéries et les lysosomes. Cette absence de fusion n'était observée que s'il existait un contact direct entre les mycobactéries vivantes et des récepteurs particuliers des macrophages. L'opsonisation et non-viabilité des bactéries sont associées à la fusion phagolysosomale. L'apparente inaccessibilité des phagosomes contenant les mycobactéries vivantes touche en particulier les endosomes tardifs et non les endosomes précoces (Fig. 2.9). Ceci a été étudié en utilisant des techniques exploitant les marqueurs spécifiques des différents compartiments de l'endocytose (les ATPases de la famille Ras, en particulier Rab5 et Rab7). Il a par ailleurs été montré que l'exclusion de la pompe à proton vacuolaire ATPase-dépendante était la cause d'une absence relative d'acidification du phagosome. Enfin, plus récemment, il a été montré que l'absence de fusion phagolysosomale était associée à la permanence de la liaison d'une molécule protéique de 50 kDa, appelée TACO (pour *tryptophan aspartate-containing coat*), à la membrane des phagosomes contenant des mycobactéries vivantes. Il est important de noter que les cellules de Küpffer du foie chez les souris n'expriment pas cette molécule et que les mycobactéries présentent une réduction de leur capacité à se multiplier dans le foie des souris.

Figure 2.9. Représentation schématique des différentes voies des marqueurs des endosomes précoces et tardifs des macrophages (schéma de gauche) et des cellules dendritiques (schéma de droite), infectés par *M. tuberculosis* H37Rv. Il existe une communauté de phénomènes dans ces deux cellules, en particulier le fait que la vacuole phagocytaire a un pH non acide, avec un maintien des molécules TACO à leur surface. Mais il faut signaler que les échanges intracellulaires sont tous inhibés dans les cellules dendritiques infectées.

Cependant, il semble que ces études, utilisant des mycobactéries cultivées dans des conditions basales, pourraient ne pas être représentatives des conditions environnementales naturelles de la transmission in vivo. En effet, une étude récente a montré que *M. tuberculosis* H37Rv, cultivé en présence d'un pH acide [6,0] et en anaérobiose, conditions proches de celles existantes au sein d'un granulome caséeux, présentait une capacité d'internalisation plus grande et que celle-ci était indépendante des récepteurs cités plus haut (CR et MR). Par ailleurs, cette même étude a montré que cette internalisation n'est pas accompagnée d'une production de TNFα et d'IL12. Il serait alors important de vérifier si la croissance intraphagocytaire de ces mycobactéries, ayant subi un changement phénotypique, demeure identique à celles qui sont cultivées de façon classique.

2.3.1.3. Mécanismes inhibiteurs de la croissance de *M. tuberculosis*

Deux mécanismes semblent être associés à l'inhibition de la croissance et à la bactéricidie des mycobactéries. Le plus important semble être celui qui est associé aux dérivés toxiques du NO (RNI), induits sous l'action combinée de l'IFNγ, de l'IL12 et du TNFα, via l'activation du gène de la NOS2 et en présence d'arginine comme substrat. Cette dépendance des dérivés RNI dans la résistance non spécifique a été bien documentée in vitro et in vivo à la fois dans la phase aiguë et la phase chronique de la maladie expérimentale chez les souris. Chez l'homme, les macrophages obtenus par lavages broncho-alvéolaires de patients tuberculeux présentent une expression accrue de la NOS2.

La place des dérivés dépendant de l'explosion oxydative (ROI) dans la résistance anti-mycobactérienne des cellules phagocytaires est plus controversée. Si les dérivés comme l'eau oxygénée (H_2O_2), générée par des macrophages activés par des cytokines, est bactéricide, il a été démontré que les différents constituants pariétaux des mycobactéries pouvaient les protéger contre ces ROI, en particulier le LAM, les glycolipides phénoliques (PGL-Tb1) et les sulfatides. Cependant, il est possible que ces deux mécanismes RNI et ROI puissent être en partie synergiques.

2.3.2. Cellules dendritiques (DC)

Depuis ces dernières années, un certain nombre d'études se sont focalisées sur la place de ces DC dans la dynamique des réponses immunitaires innées et adaptatives à la suite d'une infection par les mycobactéries. Leur localisation tissulaire, leurs capacités d'internalisation et de migration vers les organes lymphocytaires secondaires (le ganglion drainant) et leur rôle prédominant dans l'induction de l'expansion clonale des lymphocytes naïfs suggèrent une place essentielle de médiation cellulaire des DC entre les phénomènes de l'immunité innée et ceux de l'immunité acquise ou adaptative.

Deux grands aspects ont été étudiés, d'une part leur capacité d'internalisation et de restriction de la multiplication des mycobactéries vivantes et, d'autre part, leur participation dans la production des médiateurs solubles associés à la prolifération des cellules lymphocytaires naïves. Cependant, suivant les conditions expérimentales utilisées, des observations contradictoires ont été faites.

2.3.2.1. Phagocytose et survie intracellulaire

Les DC immatures issues de monocytes, mises en culture en présence de cytokines comme le GM-CSF et l'IL4, puis infectées par *M. tuberculosis* sont capables d'ingérer ces bactéries par l'intermédiaire d'un récepteur indépendant de ceux décrits pour les macrophages. En effet, cette espèce bactérienne se lie aux DC par l'intermédiaire du récepteur DC-SIGN, qui reconnaît spécifiquement la structure Man-LAM des mycobactéries à croissance lente.
Mais, contrairement à ce qui se passe dans les macrophages, les mycobactéries vivantes sont incapables de se multiplier secondairement. Il a été montré que leur localisation intravacuolaire, bien que similaire à celle dans les macrophages, était en fait déconnectée des circuits métaboliques intracytoplasmiques et donc pouvaient prévenir les échanges nutritionnels entre les mycobactéries ingérées et la cellule hôte (Fig. 2.9). Lorsque les DC sont infectées et qu'elles ne sont plus en présence des cytokines maintenant leur immaturité, elles reviennent à un état proche de celui des monocytes dans lesquels les mycobactéries présentent une croissance similaire à celle observée dans les macrophages. Cette localisation des mycobactéries vivantes dans les DC immatures pourrait ainsi expliquer leur persistance et leur dissémination dans différents tissus lymphoïdes.

2.3.2.2. Maturation, activation cellulaire et prolifération lymphocytaire

Ces différents aspects ont fait l'objet de plusieurs travaux qui ont démontré l'importance des DC dans la production d'un environnement cytokinique et dans la prolifération des lymphocytes T naïfs. L'activation des DC, comme pour les macrophages, est induite par la liaison des récepteurs TLR aux molécules agonistes issues des mycobactéries. En fonction de la liaison avec les différents TLR impliqués, des réponses différentes ont été observées, en particulier si l'on considère les cytokines produites et les facteurs membranaires de co-stimulation induits (Fig. 2.10).
Par exemple, la stimulation via le TLR4, induit la production de la molécule d'IL12 complète fonctionnelle (IL12p35 et IL12p40/IL12p70). Au contraire, la voie d'activation via le TLR2 induit seulement la production d'IL12p40, molécules qui s'homodimérisent, entraînant la perte de fonction biologique et l'inhibition des activités induites par la molécule complète. Par ailleurs, l'activation via le TLR2, conduit à la production d'IL8 (chimiokine pour la réaction inflammatoire dépendante des polynucléaires) et aucune induction de la voie de la NOS2. À l'opposé, l'activation via le TLR4, entraîne la production de cytokines comme l'IFNα et l'IP10 (impliquant la production de l'IFNγ), aboutissant in fine à la production des dérivés du NO.
Pour ajouter encore un degré de complexité, il a été montré récemment que la signalisation via les récepteurs de type C-lectin (comme le DC-SIGN et le MR) inhibe les voies d'induction via les TLR2 et TLR4.
Par ailleurs, l'internalisation, ou la signalisation via les TLR des DCs, est associée à une diminution d'expression tardive des molécules HLA de classe II avec un routage retardé des antigènes cytoplasmiques des bactéries ingérées. Cette régulation négative pourrait expliquer le phénomène d'immunodominance et le mécanisme décrit sous le nom de *freeze-frame hypothesis*. Il serait responsable de l'induction d'une réponse immunitaire majoritaire vis-à-vis d'antigènes

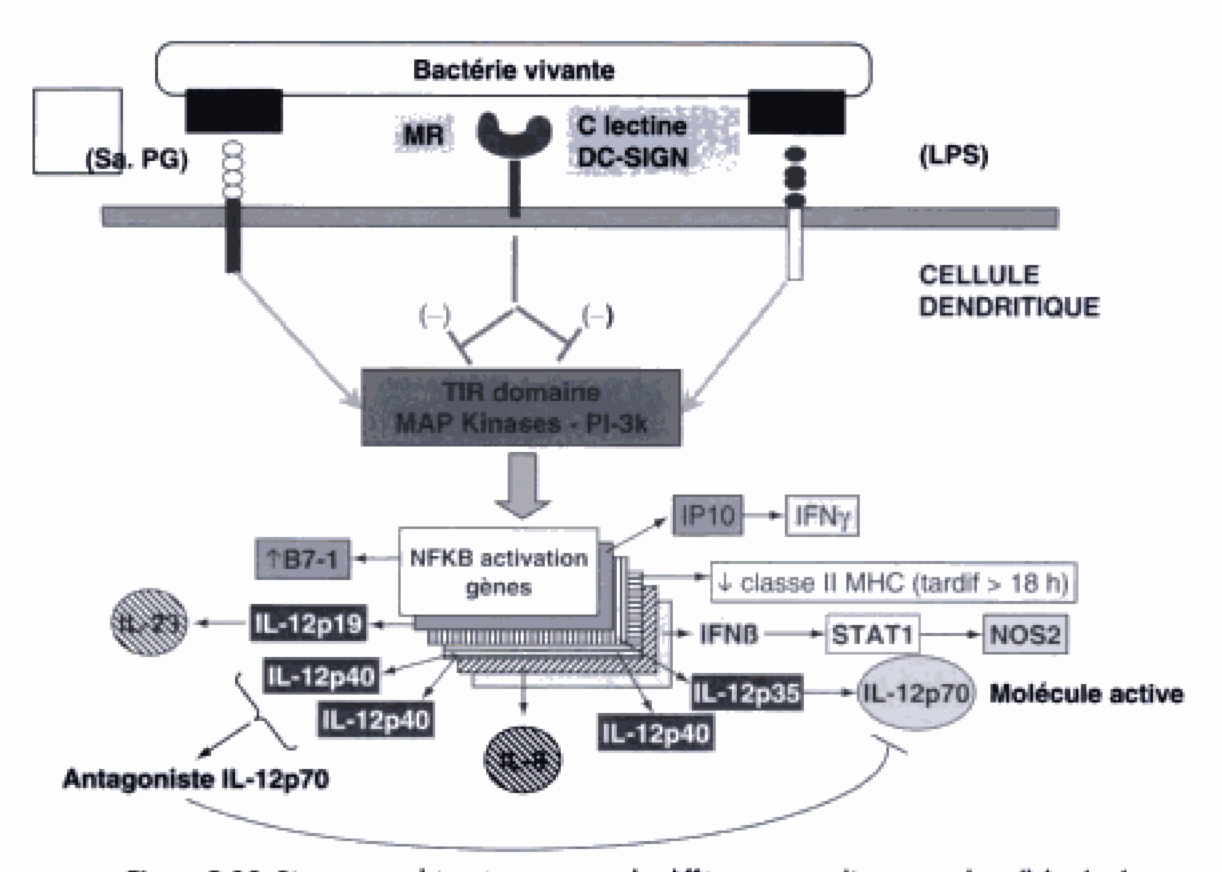


Figure 2.10. Diagramme schématique montrant les différentes voies d'activation des cellules dendritiques par l'intermédiaire de leurs récepteurs TLR de surface et les différents substrats agonistes de l'activation cellulaire. Les flèches indiquent l'activation cellulaire aboutissant à l'activation en cascade de la voie NF-κB et l'activation de différents gènes avec la représentation de leurs produits. Les traits en T indiquent un effet inhibiteur sur l'activation cellulaire, en particulier la reconnaissance par les cellules des résidus associés aux lectines C par l'intermédiaire du récepteur au mannose (MR et du DC-SIGN). Il est aussi important de noter que l'activation via le TLR2 induit des homodimères d'IL12p40 capables d'inhiber les fonctions d'activation de l'IL12p70 (flèche).

sécrétés et précocement présentés aux cellules lymphocytaires naïves par des mycobactéries vivantes.

Un autre point est important à considérer, c'est celui qui concerne le routage et la présentation des molécules non protéiques, comme les glycolipides, au sein des DC, et leur implication dans les processus de résistance acquise. Un nouveau mécanisme bactéricide intracellulaire a été mis en évidence, dépendant du relargage d'enzymes protéolytiques, comme la granulysine. Ces molécules sont introduites au sein des DC et des macrophages infectés après leur reconnaissance par des lymphocytes T (double négatif $CD4^-$/$CD8^-$, des $CD4^+$ et $CD8^+$) via un système de présentation des antigènes, indépendant des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ces molécules de présentation sont les molécules CD1, dont on décrit plusieurs isoformes (a, b, c et d), associées à la β_2-microglobuline. Il est intéressant de noter que plusieurs publications font état de la régulation négative de l'expression de ces molécules CD1 à la surface des DC infectées par *M. tuberculosis* ou *M. leprae*.

Ce phénomène pourrait ainsi représenter un mécanisme d'échappement à la résistance acquise dépendante de la reconnaissance des molécules lipidiques de surface des mycobactéries.
Enfin, il faut signaler la possibilité d'un rôle majeur des DC dans la dynamique de la formation des granulomes immunologiques. Les DC matures migrent au sein des foyers inflammatoires et se trouvent rapidement disposées en couronne à la périphérie du granulome, en contact avec les sous-populations de lymphocytes T (Fig. 2.3). Les macrophages sont en majorité retrouvés au centre du granulome. Les DC sont fonctionnelles, capables de stimuler les lymphocytes T spécifiques.

3. Réponses immunologiques vis-à-vis de *M. tuberculosis*

3.1. Modèles expérimentaux

De nombreuses espèces animales (souris, rats, cobayes, lapins) ont été utilisées pour l'étude des relations entre *M. tuberculosis* et l'hôte. Les progrès les plus pertinents sont ceux qui ont utilisé les modèles murins, du fait de leur facilité d'emploi et de la disponibilité de marqueurs cellulaires et moléculaires. Plusieurs aspects ont été abordés : l'infection expérimentale chez les souris normales et celle observée chez les souris transgéniques.

3.1.1. Infection des souris normales

Les premières observations concernaient la multiplication in vivo des mycobactéries au sein de différents organes cibles et le développement concomitant des réponses immunologiques à la suite d'une inoculation expérimentale (Fig. 2.7).
En comparant des animaux ayant un système immunitaire normal et ceux déficients, soit en lymphocytes T (les souris Nude), soit en lymphocytes B, il a été clairement établi que la réponse inflammatoire qui limite la croissance des mycobactéries à partir de la 3e–4e semaine (Fig. 2.7–ligne 2) était dépendante des lymphocytes T et non pas des réponses humorales dépendantes des lymphocytes B. Initialement, la caractérisation des lymphocytes T n'avait envisagé qu'une seule population. Après avoir reconnu les macrophages infectés par les mycobactéries, les lymphocytes T étaient responsables de la production de médiateurs recrutant et activant les monocytes. Ces derniers acquièrent de ce fait une capacité bactéricide permettant l'arrêt de croissance des mycobactéries et leur élimination (Fig. 2.11).
Plus récemment, cette population lymphocytaire T a été subdivisée suivant l'expression de leurs marqueurs membranaires et de leurs fonctions respectives. On décrit ainsi les lymphocytes T CD3^{+} CD4^{+} (fonction pro-inflammatoire et d'aide à la différenciation) (*helper-Th*), et des lymphocytes T CD3^{+} CD8^{+} (fonction cytolytique : Tc, et/ou suppressive : Ts). Ces lymphocytes spécifiques ont des récepteurs pour l'antigène. Ces récepteurs sont composés d'un hétérodimère constitué d'une chaîne α et une chaîne β : le récepteur T (TCR$\alpha\beta$). Les TCR ne reconnaissent pas l'antigène directement, mais par l'intermédiaire d'une structure de présentation des fragments antigéniques (peptides) au sein des glycoprotéines du CMH des cellules α-présentatrices de l'antigène (CPA).

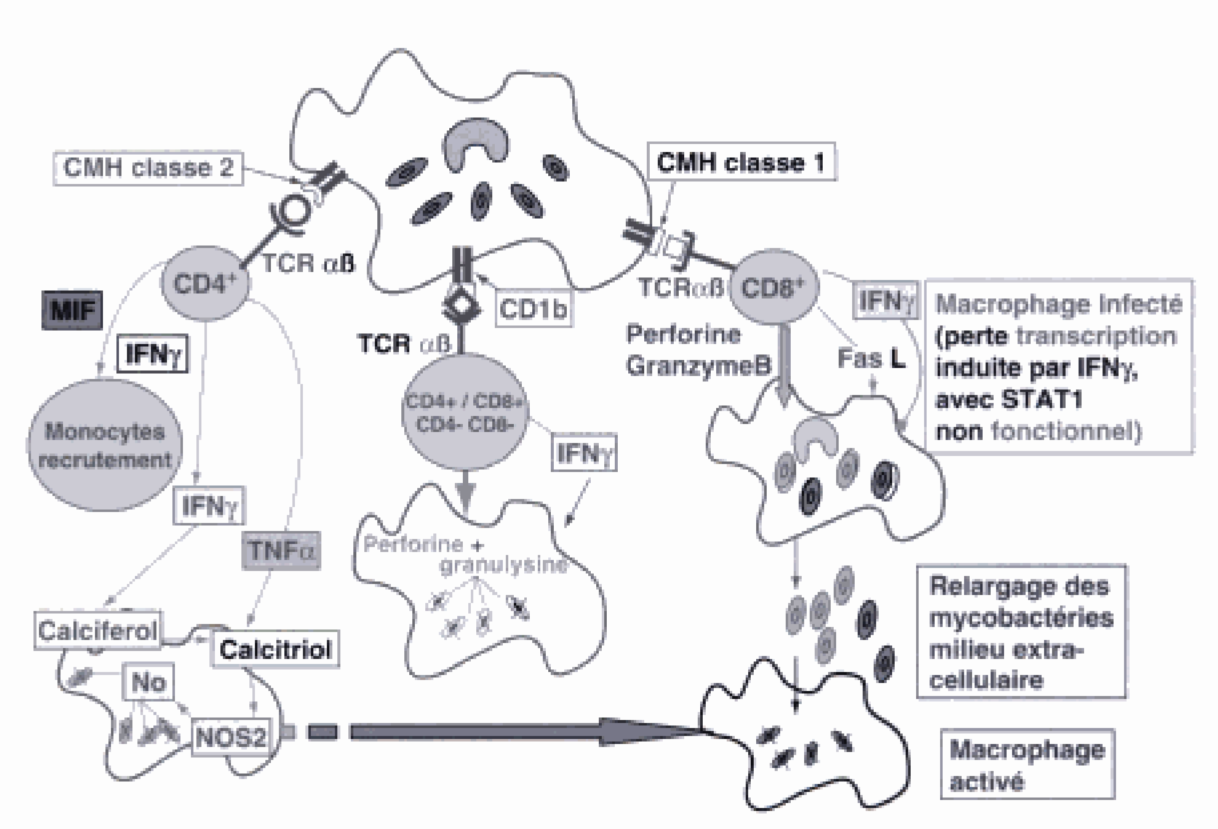


Figure 2.11. Représentation schématique des mécanismes de protection médiés par l'intermédiaire des cellules T CD4⁺, des T CD8⁺ reconnaissant les antigènes peptidiques des mycobactéries par l'intermédiaire des molécules de classe I (T CD8⁺) ou de classe II (T CD4⁺) du CMH. Notons au centre, la voie particulière de la bactéricidie intracellulaire médiée par les cellules T CD4⁺, T CD8⁺ et T CD4⁻ CD8⁻ par l'intermédiaire de la reconnaissance des molécules lipidiques présentées par les molécules CD1b. La mort bactérienne est liée au relargage de la perforine et de la granulolysine au sein des vacuoles de phagocytose des macrophages infectés. Les mycobactéries relarguées à partir des macrophages lysés par les T CD8⁺ sont phagocytées par des macrophages activés sous l'action de la voie T CD4⁺.

Cependant, la reconnaissance peptidique est restreinte aux glycoprotéines de classe I du CMH pour les lymphocytes CD8, et aux glycoprotéines de classe II du CMH pour les lymphocytes CD4. Cette présentation n'est associée à la prolifération des lymphocytes que sous la condition expresse de liaisons complémentaires : liaison des molécules CD8 ou CD4 avec d'autres protéines membranaires de type intégrine (LFA_1, ICAM) et liaison avec des structures costimulantes (B7–CD28).
Cette triple liaison intercellulaire entraîne l'activation des lymphocytes T spécifiques. Ceux-ci produisent alors des médiateurs de communications intercellulaires (cytokines, lymphokines, chimiokines) et vont se multiplier par expansion clonale. C'est ce qui se réalise en général pour les lymphocytes CD4⁺. Pour les lymphocytes CD8, à côté de la sécrétion de médiateurs (IFNγ), leur activation s'accompagne d'une différenciation aboutissant à la production de molécules cytotoxiques (granzymes, perforine) qui, par exocytose granulaire, sont responsables de la mort des cellules cibles présentes à leur contact.
Dans les modèles expérimentaux murins, il a été démontré que les deux sous-populations CD4⁺ et CD8⁺ étaient impliquées dans la limitation secondaire

acquise de la multiplication mycobactérienne. La première sous-population apparaît la première (1e–2e semaine), la seconde survient de façon retardée (4e–5e semaine). La démonstration de leur rôle respectif a été réalisée, soit par l'emploi de souris dépourvues d'une des sous-populations après injection d'anticorps monoclonaux spécifiques, soit par l'analyse du transfert des différentes sous-populations de cellules T issues de souris infectées chez des souris naïves immunodéficientes et infectées.

En général, les lymphocytes CD4+ activés représentent la source majeure de la production d'IFNγ, une faible ou une moindre quantité étant produite par les lymphocytes CD8. Suivant le profil de sécrétion des cytokines produites par ces lymphocytes (Th, Tc et Ts), on distingue deux profils majoritaires : ceux dits de type 1, ils produisent majoritairement de l'IL2, de l'IFNγ et du TNFα, ceux dits de type 2, de l'IL4, IL5, IL10, IL13. Seules les sous-populations T de type 1 sont impliquées dans les mécanismes inflammatoires à activités anti-mycobactériennes. Dans le modèle murin, en plus des fonctions de production de cytokines (IFNγ et IL2), les lymphocytes CD4 de type 1 peuvent se différencier en cellules cytolytiques reconnaissant ainsi une grande variété d'antigènes mycobactériens. La différenciation des lymphocytes CD4 et CD8 à fonction cytolytique est sous la dépendance de la production d'IL2 (Fig. 2.12).

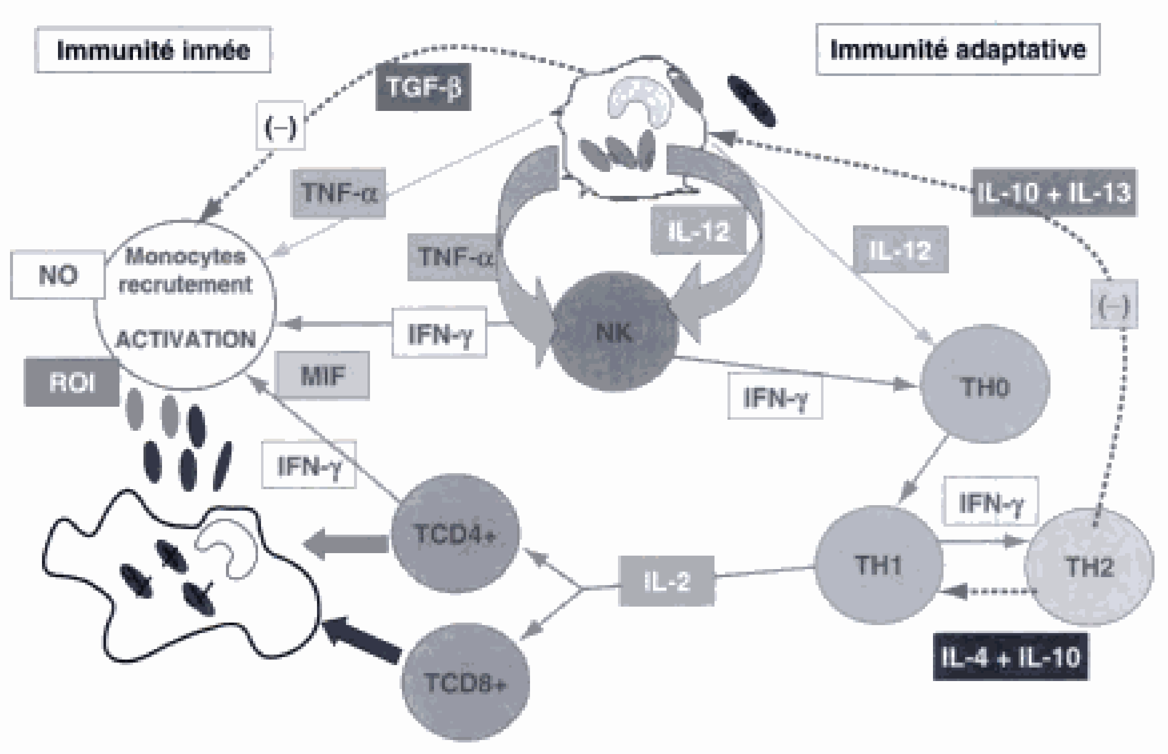


Figure 2.12. Représentation schématique de l'ensemble des phénomènes cellulaires et moléculaires aboutissant à la protection innée et acquise au cours d'une infection par des mycobactéries pathogènes. Les flèches pleines correspondent aux activités positives aboutissant à la bactéricidie avec les différents facteurs cytokiniques produits. Les flèches en pointillé correspondent aux cytokines produites ayant un effet inhibiteur sur les cellules indiquées. Les lymphocytes indiqués TH0 correspondent aux lymphocytes naïfs précurseurs des réponses adaptatives T. En fonction de l'environnement cytokinique, ces cellules peuvent évoluer, soit vers la réponse de type TH1, impliquée dans les phénomènes de protection et d'immunopathologie, soit vers la réponse de type TH2 de désactivation cellulaire.

3.1.2. Modèles expérimentaux utilisant des lignées des souris KO

L'utilisation de lignées de souris dont certains gènes ont été inactivés, lignées appelées « Knock-out » (KO), a permis de montrer l'importance du produit de ces gènes dans la restriction des mycobactéries. Les conséquences de l'inactivation de différents gènes sont illustrées dans le Tableau 2.1.

Des modèles similaires ont été étudiés plus récemment analysant le rôle de l'inactivation de gènes d'autres cytokines (IL10, IL15), de chimiokines ou de leur récepteur (CCR-2, mIR5). Aucun de ces gènes inactivés ne semble être impliqué dans les réponses immunitaires secondaires à des infections impliquant des inocula faibles ou modérés de *M. tuberculosis*.

À partir des résultats obtenus jusqu'à présent, on peut considérer que les cytokines majeures impliquées dans les mécanismes de défense contre les mycobactéries sont l'IL12, l'IFNγ et le TNFα. Aucun effet significatif n'a été retrouvé pour l'IL4, IL6 et IL10. Les sous-populations lymphocytaires majeures sont les lymphocytes T $CD4^+$ et T $CD8^+$ ayant un TCR$\alpha\beta$.

Le rôle des lymphocytes $CD8^+$ a été démontré en utilisant des souris KO pour la β_2-microglobuline, indispensable à l'expression à la membrane des molécules du CMH de classe I. Par l'absence de sélection positive dans le thymus, ces souris sont dépourvues de cellules $CD8^+$. Cette absence est associée à la multiplication non limitée de *M. tuberculosis* avec un envahissement tissulaire généralisé et la mort des souris. Fait intéressant, l'inoculation du BCG chez ces lignées de souris $CD8^-/^-$ ou β_2 $m^-/^-$ est associée à son élimination et à la survie des souris. En revanche, chez des souris KO incapables de produire de l'IFNγ ou ayant une absence de récepteur pour l'IFNγ, l'infection par le BCG était toujours disséminée et plus sévère. Il est important de souligner qu'une des chaînes des molécules CD1 est constituée de β_2-microglobuline.

Aucun effet significatif n'a été retrouvé pour les lymphocytes B et l'intervention des lymphocytes $CD8^+$ au TCR$\delta\gamma$ ne semble être limitée qu'au recrutement préférentiel des monocytes sanguins, en bloquant celui des polynucléaires au sein du foyer inflammatoire. Enfin, parmi les mécanismes moléculaires associés à la restriction de la multiplication des mycobactéries, la place des produits issus de la NOS2 semble prédominante, celle des produits de l'exocytose granulaire (perforine et granzyme B) plus restreinte, en particulier ils seraient impliqués uniquement dans la phase chronique tardive.

Dans le modèle murin, les réponses restreintes par les molécules CD-1 ne semblent pas intervenir. Seul l'isoforme CD-1d est exprimé chez les souris, et chez les souris KO pour cet isoforme, celles-ci ont un comportement identique à celui des lignées sauvages après une infection expérimentale. Les réponses restreintes aux molécules de classe I du CMH semblent être nécessaires à la résistance acquise. Ainsi, les lignées de souris déficientes en molécules de transport de peptides (TAP–/–) ont une susceptibilité plus grande à l'infection expérimentale. Les lymphocytes $CD8^+$ spécifiques pour des antigènes sécrétés de *M. tuberculosis* ont été retrouvés au sein des lésions pulmonaires de souris infectées. Ils reconnaissent les macrophages et les cellules dendritiques infectées et sont capables de lyser les macrophages, infectés avec des souches vivantes pathogènes. Il est important de signaler que les $CD4^+$ sont indispensables pour la maturation et la différenciation des $CD8^+$ par la production d'IL2. Des expériences ont également montré que les souris dépourvues de T $CD4^+$ sont dans

Tableau 2.1
Conséquences de l'infection par *Mycobacterium tuberculosis* chez la souris transgénique avec inactivation génique

Gène inactivé	Croissance bactérienne	Survie (semaines)	HSR tuberculine	Production IFNγ	Formation du granulome
IFNγ	++ (2,5 log) (poumons) (j + 28)	4 semaines	Normale	Absence	Accumulation cellulaire précoce sans granulome
TNF récepteur	+ (1 log) (rate) (j + 14)	3 semaines	–	+	Nécrose, sans organisation ni présence cellules épithéliales
IL4	Normale	Normale	Normale	+	Non observée
IL12	+++ (3,5 log) (poumons) (j + 30)	6 semaines	Absence	Absence	Accumulation macrophage sans lymphocytes
IL6	+ 1 log (poumons) (j + 30)	Normale	Normal	Retard de production	Aucune différence
TCR αβ	++ 2 log (rate) (j + 30)	6 semaines	–	Diminution nette	Nécrose importante Lyse cellulaire
TCRγδ	Normale	Normale (mortalité précoce)	–	Normale	Nécrose, abcès Pas de granulome
β2m (CD8)	+ 0,8 log (rate) (j + 30)	4 semaines	Normale	Réduite	↑ granulome, ↑ nécrose
Lympho B	Normale	Normale	Normale	Normale	Aucune différence ↑ granulome
ICAM	Normale	Normale	Absence	Normale	↑ nombre lymphocytes Absence de macrophage, monocytes
Perforine Granzyme	Normale	Normale	Normale	Normale	Pas de différence
NO synthase inductible	+++ 2,5 à 3,5 log (poumons, rate)	3 à 4 semaines	–	Normale	Pas de différence

l'impossibilité de contrôler l'infection mycobactérienne, malgré la présence importante d'IFNγ dans les poumons, produit par les CD8⁺. C'est en fait dû au retard d'apparition de cette cytokine qui est délétère. Ceci souligne le rôle majeur des cellules T CD4⁺ au stade précoce de l'infection.

Un mécanisme d'évasion de *M. tuberculosis* a été mis en évidence : cette bactérie phagocytée par des macrophages est capable d'inhiber partiellement les réponses transcriptionnelles produites par l'IFNγ en interrompant l'interaction du facteur STAT1 avec les co-activateurs CBP et p300.

L'activité cytotoxique des T CD8⁺ semble contribuer à la protection anti-mycobactérienne suivant deux voies. La lyse des macrophages infectés, incapables d'être activés, permettrait le relargage des mycobactéries qui seront alors reprises par des monocytes activés. Une autre modalité de cytotoxicité a été rapportée, associée à l'induction d'une apoptose liée au système Fas FasLigand (Fig. 2.11).

3.2. Réponses immunitaires chez l'homme

Un certain nombre d'arguments cliniques et biologiques ont démontré le rôle du système immunitaire dépendant des lymphocytes T dans la protection, la guérison et l'immunopathologie associée à la tuberculose chez l'homme. Par ailleurs, comme dans les modèles expérimentaux, les lymphocytes T impliqués reconnaissent les antigènes mycobactériens, in vitro ou in vivo, grâce aux CPA (cellules dendritiques et macrophages). Ils produisent majoritairement des cytokines de types IFNγ et IL2, témoignant de leur appartenance à la sous-population T de type 1. Cette démonstration a été confortée par la mise en évidence du rôle des déficits spontanés liés à l'absence d'expression des récepteurs de l'INFγ et ceux de l'IL12.

Comparant la fréquence et le type des cellules présentes dans différents sites infectieux (plèvre, liquide pleural) par rapport aux cellules sanguines circulantes, certains auteurs ont démontré l'existence d'une compartimentalisation des cellules produisant les cytokines pro-inflammatoires de type 1 aux sites infectieux, les autres cellules (Th_2) étant alors prédominantes dans le sang circulant. Néanmoins, la présence des cellules CD4⁺ (Th_1) ne préjuge en rien de leur rôle protecteur, tout au plus peut-on les considérer comme intervenant secondairement dans les phénomènes immunopathologiques résolutifs et agissant pour la guérison.

Ainsi, à l'appui de cette notion, deux arguments cliniques peuvent être retenus. L'existence d'une relation inverse entre la réponse des cellules T in vitro et l'extension des lésions tuberculeuses chez les patients. Il est ainsi fréquent de constater l'absence de réponse cutanée à la tuberculine et la faible réponse in vitro chez les patients atteints de tuberculose disséminée. À l'opposé, les individus qui présentent une maladie mineure, ou qui ont guéri spontanément (la majorité) d'une tuberculose infection, ont des réponses d'HSR cutanée forte et leurs lymphocytes T répondent in vitro très bien aux antigènes spécifiques. Enfin, en cas d'immunodépression, touchant sélectivement les populations de lymphocytes T CD4⁺, comme cela est observé chez les sujets co-infectés par le VIH, on constate la réactivation fréquente d'une tuberculose infection guérie et/ou une évolution rapide vers la tuberculose maladie plus ou moins disséminée en fonction du nombre de cellules T CD4⁺ circulantes.

Trois fonctions ont été reconnues aux lymphocytes T $CD4^+$: une fonction pro-inflammatoire ($IFN\gamma$ et $TNF\alpha$-dépendante), une fonction d'aide à la prolifération (classique fonction *helper*, production d'IL2) et une fonction cytolytique. Ces trois fonctions ont été étudiées dans ces modèles ex vivo chez des patients ayant une réponse positive à la tuberculine. Si l'inactivation bactérienne au sein des macrophages, liée à la seule présence de l'$IFN\gamma$ et du $TNF\alpha$, a parfaitement été démontrée in vitro dans les modèles murins, celle-ci n'a jamais été parfaitement reproduite dans les modèles humains d'études in vitro, à la différence de l'efficacité potentielle d'une inactivation bactérienne en présence de cellules T $CD4^+$ cytolytiques. Les mécanismes moléculaires de cette inactivation mycobactérienne ne sont pas connus, mais pourraient faire intervenir soit l'apoptose des macrophages, soit le relargage de molécules à activité cytolytique (perforine et granzyme B).
Les autres lymphocytes T, induits et activés au cours de l'infection tuberculeuse humaine sont les lymphocytes T $CD8^{+\,\alpha\beta}$ et les lymphocytes T $CD8^{+\,\gamma\delta}$. En ce qui concerne la place des lymphocytes T $CD8^+$, une seule publication fait état de leur rôle potentiel chez un malade VIH (–) présentant une tuberculose persistante, malgré un traitement parfaitement supervisé, avec une réduction isolée et prolongée dans le sang du nombre des lymphocytes $TCD8^+$.
Cependant, des données récentes, bien que partielles, ont démontré l'existence de cellules T $CD8^+$ cytolytiques (CTL) chez l'homme. Il a ainsi été observé la présence de ces cellules à la périphérie des lésions et l'expansion de lignées CTL $CD8^+$ produisant des grandes quantités d'$IFN\gamma$ chez des patients tuberculeux. Il semble que deux groupes de CTL T $CD8^+$ puissent être considérés suivant la restriction de la reconnaissance des antigènes et les antigènes reconnus (Fig. 2.11). Le premier regroupe les CTL $CD8^+$ qui reconnaissent certains antigènes protéiques, comme l'ESAT6 (protéine de faible poids moléculaire d'un filtrat de culture des mycobactéries) par l'intermédiaire des glycoprotéines de classe I du CMH. Le deuxième groupe a été décrit plus récemment, il est relatif aux CTL double négatif ($CD4^-/CD8^-$) et $CD8^+$ capables de reconnaître des antigènes non peptidiques (comme le Man-LAM) par l'intermédiaire d'une présentation dépendante des isoformes CD1-a et CD1-b. Ces molécules sont non polymorphes, c'est-à-dire qu'elles sont exprimées de façon commune à toute une population. Un des mécanismes d'évasion des mycobactéries pathogènes pourrait être la régulation négative de l'expression des isoformes CD1-b et CD1-a, permettant à ces cellules de ne pas être reconnues par les CTL. Ces cellules produisent de l'$IFN\gamma$, mais sont aussi capables de lyser les cellules infectées et d'inhiber la croissance intracellulaire des mycobactéries. Un des mécanismes moléculaires de cette inhibition est lié à la production d'une sérine-protéase, la granulysine, qui agit en association avec la perforine pour entraîner une lyse bactérienne au sein des cellules infectées.
En ce qui concerne les lymphocytes $T\gamma\delta$, plusieurs publications démontrent leur participation dans la réponse immunologique vis-à-vis des mycobactéries chez l'homme. Néanmoins, le rôle et les fonctions de ces cellules demeurent encore largement méconnus. Capables de produire différentes cytokines ($IFN\gamma$, et IL2) et d'avoir une activité cytolytique, ces cellules reconnaissent différents types d'antigènes. Ainsi, une première sous-population de lymphocytes $T\gamma\delta$ reconnaît des protéines de stress, comme les protéines de choc thermique produites par les mycobactéries (Hsp 65 kDa) CMH restreintes,

alors qu'une autre sous-population de lymphocytes Tγδ reconnaît seulement les macrophages infectés par des mycobactéries vivantes ou sensibilisés par des antigènes mycobactériens de type isoprényl pyrophosphate. La première population prédomine dans les tissus inflammatoires immunopathologiques (polyarthrite rhumatoïde, lésions cutanées de la lèpre...) alors que la seconde est retrouvée dans le sang circulant avec une reconnaissance non restreinte par le CMH, mais dépendante de la présence de mycobactéries vivantes. Il a été proposé que la seconde sous-population pourrait jouer un rôle initiateur lors de l'infection primaire, alors que la première sous-population pourrait exercer son action à un stade plus tardif. En effet, cette dernière agirait comme des cellules régulatrices des réponses auto-immunes visant à diminuer la réponse inflammatoire par la destruction des macrophages ou des cellules dendritiques qui sont la source des molécules inflammatoires (TNFα...) lors de l'expression des protéines de choc thermique.

L'évolution des lésions tissulaires provoquées par les réponses inflammatoires et cytolytiques T-dépendantes et la production de cellules T-mémoires serait sous la dépendance directe d'une régulation complexe faisant intervenir de nombreuses cellules et médiateurs directement influencés par l'importance et la répétition de l'inoculum infectant, de son devenir immédiat et des conséquences liées à la plus ou moins grande capacité de l'hôte à réguler les réponses immunologiques T-dépendantes.

Ainsi, en présence d'un inoculum faible et avec une régulation efficace de la réponse inflammatoire, les cellules dendritiques seraient capables de présenter les antigènes aux cellules T $CD4^+$ (Th_1) qui, grâce à la production locale des cytokines pro-inflammatoires, induisent la formation d'un granulome, dont la régulation négative (liée à la faible production d'antigène) laisserait libre la circulation de la population des lymphocytes T-mémoires, responsables de la protection à long terme vis-à-vis des réinfections exogènes.

Au contraire, en cas d'inoculum massif, ou si la réponse innée antimycobactérienne initiale est faible, inhibée ou retardée, l'importance de la masse antigénique et donc de la réaction inflammatoire T-dépendante ($CD4^+$ Th_1, $CD4^+$ et $CD8^+$ CTL) entraîne des destructions cellulaires et tissulaires, associées à la production de cytokines désactivatrices (IL10, *transforming growth factor β* ou TGFβ). Celles-ci pourraient contribuer à favoriser la dissémination locale et générale des mycobactéries pathogènes, sans que n'émergent des cellules T-mémoires.

4. Polymorphisme des réponses immunitaires et des mécanismes de résistance

Plusieurs publications récentes font état d'un polymorphisme relatif à la variabilité de la susceptibilité ou de la résistance à la tuberculose en fonction des individus infectés. Cette notion est ancienne et avait été évoquée d'une part chez l'homme par l'étude des jumeaux homozygotes et, d'autre part, dans différentes espèces animales, les souris, les cobayes et les lapins. Seul le modèle murin a fait l'objet d'études systématiques de recherche de gène candidat pour expliquer une relative susceptibilité à la tuberculose.

Dans le modèle murin d'infection expérimentale par des mycobactéries, l'analyse génétique a montré l'existence d'une mutation sur le gène NRAMP1 dans les lignées qui ont un comportement décrit comme résistant vis-à-vis d'une infection avec le BCG. Ce phénotype de résistance est retrouvé in vivo et in vitro en utilisant les macrophages en culture. Par ailleurs, il a été démontré que le produit de ce gène est exprimé de façon quasi exclusive sur la membrane interne des phagosomes des cellules du système phagocytaire mononucléé. Les mécanismes associés à cette mutation ne sont pas entièrement connus, ils semblent être associés à une activation constitutionnelle des macrophages. Cette mutation semble n'affecter que les infections par des mycobactéries peu pathogènes, et sa présence ne semble pas avoir de conséquences dans les infections par *M. tuberculosis*. Seule une diminution de la croissance des mycobactéries pathogènes au sein des macrophages est observée.

Les études réalisées chez l'homme ont montré qu'il existait un équivalent au modèle des souris KO, démontrant une susceptibilité particulière chez certains individus vis-à-vis des mycobactéries habituellement classées comme non pathogènes (*M. avium*, BCG). Ces désordres sont dus à un défaut d'un gène majeur et affectent principalement la cascade des cytokines de type 1 et plus particulièrement la défense antibactérienne médiée par l'IFNγ dépendante de la production de l'IL12 (Casanova et Abel, 2002). Les autres études menées chez l'homme ont étudié les associations entre la présence et/ou la gravité de la tuberculose et un certain nombre de marqueurs. La fréquence des associations a été trouvée plus grande chez les sujets que chez les témoins sains.

Des études récentes, réalisées en Gambie (Afrique) chez l'homme, ont indiqué une association possible d'un polymorphisme du gène NRAMP1 et d'une plus grande susceptibilité à la tuberculose, mais aucune liaison de ce type n'a été observée en Inde. Ces différences sont peut-être liées aux différentes populations étudiées, à la qualité des diagnostics utilisés et aux groupes témoins choisis. En revanche, cette liaison semble être présente chez les aborigènes tuberculeux du Canada.

Plusieurs autres études ont été menées envisageant d'autres gènes candidats associés à la susceptibilité. Parmi les études les plus significatives, signalons celle qui implique le récepteur à la vitamine D_3 (VDR) et celle impliquant les molécules de classe II du MHC. La première démontre qu'il existe une association très forte entre le polymorphisme du VDR et la fréquence des tuberculoses pulmonaires graves chez des sujets végétariens ayant une avitaminose D. La seconde montre que les patients porteurs d'une tuberculose grave, non guérie par le traitement antituberculeux classique, ont une fréquence d'association plus grande avec certains phénotypes HLA, en particulier DRB1*1501 et DQB1*0601.

Enfin plus récemment, une étude familiale globale du génome humain à la recherche de régions chromosomiques (contenant potentiellement un gène majeur de susceptibilité) chez des enfants atteints de tuberculose et leurs présences chez les parents a permis de montrer que certaines de ces régions étaient héritées plus fréquemment que par chance. Parmi les marqueurs associés à une susceptibilité à la tuberculose, deux semblent avoir une fréquence plus importante. Ils sont présents sur les chromosomes 15q et Xq. Ceci tend à

montrer que la résistance ou la susceptibilité n'est pas monogénique, en particulier chez les populations qui ont une longue histoire d'infection tuberculeuse. Il est par ailleurs possible que cette résistance au sein d'une population donnée soit en fait le résultat d'une sélection négative des individus sélectionnés par leur plus grande sensibilité au début de l'épidémie. Enfin, la résistance à la maladie doit être évaluée à la fois au niveau des mécanismes de l'immunité innée et de ceux de la régulation de la réponse adaptative.

5. Conclusion

Durant ces dernières années, une quantité remarquable de nouvelles informations ont été recueillies concernant les réponses immunitaires vis-à-vis des mycobactéries. Beaucoup de données relatives aux réponses cellulaires et moléculaires au cours des tuberculoses humaines ou expérimentales murines ont été recueillies. En particulier, les rôles des lymphocytes T, de leurs sous-populations (CD4 et CD8), dans la production de cytokines pro-inflammatoires et leurs capacités cytolytiques, ont été clarifiés. D'importantes nouvelles informations ont été apportées concernant le comportement des mycobactéries pathogènes au sein des cellules phagocytaires, tels les macrophages et les cellules dendritiques. La majorité des études expérimentales a été réalisée dans des modèles murins qui ont permis de décrire les différentes phases de l'infection correspondant à l'émergence des différentes sous-populations de lymphocytes T, de leurs cytokines respectives et du répertoire antigénique reconnu. Néanmoins, malgré ces nouvelles informations, certaines d'entre elles ayant été confirmées chez l'homme atteint de tuberculose maladie, de nombreux points demeurent inconnus, en particulier ceux qui concernent les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la protection acquise à long terme.

Pour en savoir plus

Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. Lancet 2000 ; 356 : 1099-104.

Blanden RV, Lefford MJ. Mackaness GB. Host response to Calmette-Guérin bacillus in mice. J Exp Med 1969 ; 129 : 1079-1107.

Bothamley GH, Festenstein F, Newland A. Protective role for CD8 cells in tuberculosis. Lancet 1992 ; 339 : 315-16.

Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria : the human model. Annu Rev Immunol 2002 ; 20 : 581-620.

Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffen JP, Russel DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon γ-gene disrupted mice. J Exp Med 1993 ; 178 : 2243-4.

D'Arcy Hart P, Armstrong J, Brown CA, Draper P. Ultrastructural study of the behavoir of macrophages toward parasitic mycobacteria. Infect Immun 1972 ; 5 : 803-7.

Dannenberg AM, Rook GAW. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis : an interplay of tissue-damaging and macrophage-activating immune responses, dual mechanisms that control bacilly multiplication. In : Bloom BR, Ed. Tuberculosis, pathogenesis and control. Washington : ASM ; 1994. p. 459-83.

Dannenberg Jr AM. Roles of cytotoxic delayed-type hypersensitivity and macrophage-activating cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. Immunobiology 1994 ; 191 : 461-73.

El-Etr SH, Cirillo JD. Entry mechanisms of mycobacteria. Front Bioscience 2001 ; 6 : 737-47.

Engering A, Geijtenbeek TBH, van Kooyk Y. Immune escape through C-type lectins on dendritic cells. Trends Immunol 2002 ; 23 : 480-5.

Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. Annu Rev Immunol 2001 ; 19 : 93-129.

Harty JT, Bevan MJ. Responses of CD8+ T cells to intracellular bacteria. Curr Op Immunol 1999 ; 11 : 89-93.

Heldwein KA, Fenton MJ. The Toll-like receptors in immunity against mycobacterial infection. Microbes Infection 2002 ; 4 : 937-44.

Iyonaga K, McCarthy KM, Schneeberger EE. Dendritic cells and the regulation of a granulomatous immune response in the lung. Am Respir Cell Mol Biol 2002 ; 26 : 671-6.

Kaufmann SHE. CD8+ T lymphocytes in intracellular microbial infection. Immunol Today 1988 ; 9 : 168-74.

Lagrange PH, Wargnier A. Bases cellulaires et moléculaires des réponses immunitaires aux infections bactériennes et virales. Rev Fr Allergol 1998 ; 38 : 225-40.

North RJ, Izzo AA. Mycobacterial virulence. Virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* have faster in vivo doubling times and are better equipped to resist growth-inhibiting functions of macrophages in the presence or absence immunity. J Exp Med 1993 ; 177 : 1723-33.

Orme IM, Andersen P, Boom WH. T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis 1993 ; 167 : 1481-97.

Rockett K, Brookes R, Udalova I, Vidal V, Hill AV, Kwiatkowski D. 1,25-dihydrovitamin D3 induces nitric oxide synthase and suppresses growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophage-like cell line. Infect Immun 1998 ; 66 : 5314-21.

Russel DG. *Mycobacterium tuberculosis* : here today, and here tomorrow. Nat Rev 2001 ; 2 : 569-77.

Selwyn PA, Hartel D, Lewis VA, Schoenbaum EE, Vermund SH, Keil RS, et al. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. N Engl J Med 1989 ; 320 : 545-50.

Shiloh MU, Nathan CF. Reactive nitrogen intermediates and the pathogenesis of Salmonella and mycobacteria. Curr Op Microbiol 2000 ; 3 : 35-42.

Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, et al. An antimicrobial activity of cytolotic T cells mediated by granulysin. Science 1998 ; 282 : 121-25.

Stenger S, Modlin RL. Control of *Mycobacterium tuberculosis* through mammalian Toll-like receptors. Curr Op Immunol 2002 ; 14 : 452-7.

Stenger S, Modlin RJ. Cytotoxic T cell responses to intracellular pathogen. Curr Op Immunol 1998 ; 10 : 471-77.

Tailleux L, Schwartz O, Hermann JL, Pivert E, Jackson M, Amara A, et al. DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. J Exp Med 2003 ; 197 : 121-7.

Tailleux L, Neyrolles O, Honoré-Bonakline S, Perret E, Sanchez F, Abastado JP, et al. Constrained intracellular replication of *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. J Immunol 2003 ; 170 : 1939-48.

Ulrichs T, Kaufmann SHE. Mycobacterial persistence and immunity. Front Bioscienc 2002 ; 7 : 458-69.

Chapitre 3

Infections dues aux mycobactéries tuberculeuses chez l'adulte

Christophe Billy, Christian Perronne

Aspects cliniques
Traitement
Prévention

La tuberculose est toujours une maladie d'actualité. C'est la première cause de mortalité infectieuse dans le monde due à un germe unique (plus de trois millions de décès par an). Plus de 95 % de la mortalité et de la morbidité s'observent dans les pays en développement. Un tiers de la population mondiale est infecté par des bacilles de la tuberculose, avec huit millions de nouveaux cas de tuberculose active par an, dont 80 % des cas en Afrique. La moitié d'entre eux est fortement contagieuse. La co-infection par le VIH amplifie l'épidémie dans certains pays, mais le principal facteur d'amplification est l'exode rural, l'insalubrité et la malnutrition. Des traitements antituberculeux mal conduits augmentent la fréquence de la tuberculose résistante et des malades contagieux porteurs de bacilles.

Les bactéries responsables de la tuberculose humaine sont des mycobactéries du complexe tuberculosis : *Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis* et *Mycobacterium africanum*. Ce sont des bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR), aérobies stricts.

La tuberculose pulmonaire est presque toujours due à *M. tuberculosis* (bacille de Koch). La contamination est essentiellement interhumaine, par voie aérienne, à partir de gouttelettes de sécrétions respiratoires aérosolisées (gouttelettes de Pflügge). La primo-infection tuberculeuse (PIT) suite à l'inhalation de bacilles guérit habituellement spontanément. Cependant, les bacilles peuvent rester vivants sous forme latente (bacilles dormants) pendant des années. L'infection tuberculeuse définit le portage chronique asymptomatique de *M. tuberculosis* après la guérison apparente de la PIT. La tuberculose active ou tuberculose maladie, habituellement pulmonaire, correspond à la réactivation des bacilles pouvant survenir à n'importe quel moment. La réactivation de la maladie est favorisée par une baisse de l'immunité cellulaire : vieillissement, stress, malnutrition, mais surtout immunodépression (infection par le VIH, leucémies, transplantation d'organe, chimiothérapie, diabète, corticothérapie prolongée, dénutrition sévère, etc.). Une dissémination est possible, par voie lymphatique ou par voie sanguine entraînant une tuberculose miliaire hématogène. Une localisation extrapulmonaire apparaît dans 25 % des cas, plus fréquemment dans certaines immunodépressions (environ 70 % au cours de l'infection à VIH). En l'absence de traitement, la tuberculose pulmonaire active est mortelle dans 50 % des cas. La moitié des survivants (25 %) guérit spontanément ; l'autre moitié (25 %) devient des porteurs chroniques de bacilles contribuant à propager la maladie. Sous traitement adapté et correctement suivi, la tuberculose devrait toujours guérir. Le pronostic de la tuberculose multirésistante est beaucoup plus sombre (jusqu'à 80 % de mortalité chez l'immunodéprimé).

1. Aspects cliniques

1.1. Primo-infection tuberculeuse (PIT)

La primo-infection tuberculeuse (PIT) est souvent asymptomatique, ou entraîne une altération discrète de l'état général avec asthénie et fièvre modérée. On observe plus rarement un érythème noueux, une kérato-conjonctivite phlycténulaire ou une pleurésie sérofibrineuse. La radiographie thoracique montre dans la forme typique le complexe gangliopulmonaire (petit nodule parenchymateux

associé à une adénopathie médiastinale homolatérale). Le nodule et l'adénopathie peuvent se calcifier après la guérison. Les lésions pulmonaires cicatricielles fines calcifiées, souvent à localisations apicales chez l'adulte, peuvent renfermer des bacilles viables susceptibles de provoquer ultérieurement un réveil actif de la maladie (réactivation endogène de l'infection). Si ce premier contact infectant survient à un âge avancé ou sur un sujet fragilisé (patient atteint du sida), l'évolution peut se faire d'emblée vers une forme pneumonique excavée à dissémination bronchogénique. Une diffusion par voie sanguine et lymphatique est aussi possible et peut conduire à une forme disséminée appelée miliaire tuberculeuse. Cette forme disséminée hématogène est fréquemment associée à une méningite dans les semaines qui suivent. La seule méthode diagnostique de la PIT est la mise en évidence d'une hypersensibilité retardée par un virage de l'intradermoréaction (IDR) à la tuberculine. Une induration < 5 mm est considérée négative. Une induration ≥ 5 mm est considérée positive. Cependant, une IDR entre 5 et 9 mm est dans une zone d'interprétation incertaine ; l'interprétation dépend du contexte épidémiologique (enquête autour d'un cas, surveillance systématique, etc.) et les caractéristiques individuelles de chaque sujet au moment de la réalisation du test (antécédent et délai du vaccin BCG, facteurs pouvant influencer l'IDR). L'IDR peut être minorée, voire négativée, dans certaines circonstances réduisant l'immunité cellulaire (infections virales, infection par le VIH, immunodépression, corticothérapie et immunosuppresseurs, vieillesse, dénutrition). Le virage tuberculinique est défini, dans des conditions standard, par une première IDR (5 unités de tuberculine PPD Tubertest® = 0,1 ml) négative, suivie d'une deuxième IDR, réalisée au mieux trois mois après le contage, positive pour un diamètre d'induration ≥ 10 mm. Lorsqu'il existe une réaction de faible diamètre sur la première IDR (entre 5 et 9 mm), le diamètre de l'induration doit augmenter de plus de 10 mm lors de la 2e IDR.

1.2. Tuberculose pulmonaire commune

La tuberculose pulmonaire commune atteint en priorité les sommets lobaires et les segments postérieurs du parenchyme pulmonaire avec une tendance évocatrice à évoluer vers l'excavation. Les raisons invoquées pour expliquer cette topographie particulière sont la présence d'oxygène prédominante aux apex et correspondant à la caractéristique aérobie du bacille, ainsi que la moindre circulation lymphatique à ce niveau.

De façon générale, on considère que, dans les pays industrialisés où le risque de contagion est bas, le développement d'une tuberculose active correspond à une réactivation endogène de la maladie, alors qu'il s'agirait plutôt d'une ré-infection exogène dans les pays à forte endémicité.

Les signes cliniques associent habituellement une altération de l'état général avec asthénie, amaigrissement, fièvre, sueurs nocturnes, et des signes respiratoires (toux prolongée, expectoration mucopurulente ou hémoptoïque, douleurs thoraciques). La radiographie thoracique est évocatrice montrant des infiltrats remontant du hile vers les sommets uni- ou bilatéraux, souvent excavés. On observe parfois un nodule isolé (tuberculome), ou un aspect de pneumonie tuberculeuse, dont l'image est systématisée. Des adénopathies médiastinales satellites sont fréquentes. Un épanchement pleural est possible.

La scannographie n'est pas indispensable mais permet de mieux observer les lésions, notamment les cavernes et les adénopathies. Les examens biologiques courants sont peu contributifs. La vitesse de sédimentation peut être normale ou élevée. L'IDR est souvent fortement positive, voire phlycténulaire ; mais une IDR négative n'élimine pas le diagnostic.
Les présentations radiologiques de la maladie peuvent être très variées. Elles reflètent le conflit entre la progression de l'infection et les capacités de défense du sujet. Ainsi, on peut observer une évolution plus fréquente vers la formation de cavernes apicales chez les adolescents et les jeunes adultes, alors que cette caractéristique semble diminuée à l'âge moyen et au-delà. Après 60–65 ans, la présentation radiologique peut plus volontiers se rapprocher des observations de primo-infections chez l'enfant sans les adénopathies médiastinales ; elles prennent un aspect d'opacités mal délimitées touchant les bases ou les champs pulmonaires moyens, parfois associées à une atteinte pleurale.
Le diagnostic repose avant tout sur la recherche de bacilles dans l'expectoration en microscopie (bacilloscopie), recueillie le matin, trois jours de suite. Si le malade ne crache pas, on a recours au tubage gastrique réalisé le matin à jeun. Cet examen microscopique direct minutieux des crachats après la coloration de Ziehl-Neelsen permet de retrouver des BAAR dans environ la moitié des cas (malades bacillifères contagieux). La bacilloscopie, seule méthode diagnostique disponible en routine, est d'un intérêt majeur pour le diagnostic des formes pulmonaires les plus sévères et pour la prévention de la transmission (dépistage des malades contagieux). Les crachats peuvent être mis en culture sur milieu de Löwenstein-Jensen. Les bacilles sont à croissance lente, poussant en trois à six semaines. Des antibiogrammes peuvent ensuite être réalisés pour tester leur sensibilité aux antituberculeux. L'amplification génique par PCR (*polymerase chain reaction*) est moins sensible que la culture classique mais est très spécifique. Sa réalisation n'est pas de pratique courante et relève d'un laboratoire spécialisé. En l'absence de BAAR au direct, une fibroscopie bronchique peut être indiquée pour aspiration, biopsie ou lavage broncho-alvéolaire.

1.3. Tuberculose miliaire

La tuberculose miliaire est une infection généralisée, disséminée par voie hématogène (poumons, foie, rate, moelle osseuse, méninges, etc.) faite de multiples granulomes de la taille d'un grain de mil (miliaire). Une forme suraiguë entraîne un syndrome de détresse respiratoire aiguë (miliaire asphyxiante). La radiographie thoracique montre des images micronodulaires (1 à 2 mm) disséminées dans les deux champs pulmonaires. L'examen direct des crachats est souvent négatif (deux tiers des cas). Des hémocultures sur milieu spécial peuvent être positives. Une ponction lombaire doit être réalisée en cas de signes méningés. Une biopsie de foie ou de moelle osseuse peut être indiquée à la recherche de granulomes tuberculoïdes, voire de BAAR. Tous les prélèvements doivent être mis en culture. L'IDR est souvent négative car l'hypersensibilité non encore acquise.
La forme miliaire survient classiquement peu de temps après une primo-infection ou à un stade terminal d'évolution d'une tuberculose chronique non

traitée. Des facteurs prédisposants ont été décrits tels que l'alcoolisme, une cirrhose, un cancer, la grossesse en particulier dans la période du post-partum, un traitement par immunosuppresseurs ; mais en revanche il n'existe souvent aucun antécédent de tuberculose. Les manifestations cliniques et biologiques n'ont pas de spécificité. En revanche, les opacités radiographiques micronodulaires disséminées « en grains de mil », à la limite du visible, sont évocatrices. Le traitement doit être rapidement initié. Des formes fulminantes peuvent se présenter associées à une insuffisance respiratoire aiguë et à une coagulation intravasculaire disséminée, qui sont une indication à une corticothérapie adjuvante (prednisone 1 mg kg^{-1} j^{-1}).

1.4. Formes extrapulmonaires

Les formes extrapulmonaires de tuberculose, associées ou non à une atteinte pulmonaire, représentent environ un quart de cas déclarés. L'infection des différents organes par voie hématogène, lymphatique ou aérienne peut se traduire par une localisation prédominante alors que le foyer initial a depuis longtemps disparu. Le diagnostic repose sur l'isolement du BK (urines, LCR) ou sur l'anatomopathologie (ganglion, os, moelle osseuse, etc.).

1.4.1. Tuberculose ganglionnaire

Les adénopathies sont la forme de tuberculose extrapulmonaire la plus fréquente. La présentation est en général unilatérale et cervicale. Les adénopathies multiples, ou à localisation autre que cervicale, correspondent à des tuberculoses plus importantes, plus souvent associées à des signes généraux (fièvre, perte de poids) et à une localisation pleuropulmonaire concomitante. Ces formes plus généralisées sont en particulier décrites au cours du sida. L'aspiration du ganglion à l'aiguille fine est peu rentable pour le diagnostic. La biopsie exérèse permet mieux d'isoler *M. tuberculosis* et d'objectiver parfois une histologie évocatrice.
Des évolutions paradoxales peuvent survenir sous traitement adapté, tels qu'une augmentation de la taille des ganglions ou l'apparition de nouvelles adénopathies, une fistulisation. Ces manifestations ne signifient pas obligatoirement l'échec du traitement, mais correspondent à une réactivité aux antigènes tuberculeux. L'évolution se fait spontanément vers la régression mais peut nécessiter une corticothérapie adjuvante.
Dans le cas d'adénopathies profondes, en particulier médiastinales, le diagnostic différentiel est difficile avec un cancer ou un lymphome. Un aspect tomodensitométrique hypodense du centre du ganglion et prise de contraste à sa périphérie est évocateur d'une origine tuberculeuse.

1.4.2. Tuberculose osseuse

La plus fréquente est la spondylodiscite tuberculeuse ou mal de Pott, correspondant à une atteinte vertébrale et discale avec formation d'abcès froids paravertébraux pouvant entraîner des déformations rachidiennes et des tassements vertébraux ainsi que des complications neurologiques par compression. Des ostéo-arthrites tuberculeuses touchant les structures périphériques sont également décrites. Dans la majorité des cas, elles se présentent sous la forme

d'une mono-arthrite chronique, touchant plus fréquemment la hanche ou le genou. Des abcès froids peuvent se développer au contact de l'articulation et se fistuliser. Des co-infections à germes banals peuvent coexister, voire même être le mode de révélation de l'infection tuberculeuse sous-jacente. De plus, le diagnostic différentiel peut être difficile lorsque la tuberculose se développe sur une articulation pathologique préexistante (goutte, arthrite inflammatoire, etc.). En l'absence d'une autre atteinte tuberculeuse extra-articulaire, la biopsie osseuse à visée microbiologique et histologique est nécessaire au diagnostic. Le traitement est en priorité médical et prolongé ; le recours à la chirurgie est licite en cas d'instabilité articulaire et à envisager après échec du traitement médical.

1.4.3. Pleurésie, péricardite et péritonite tuberculeuses

L'extension à la plèvre ou au péricarde se fait par suffusion de contiguïté. Les pleurésies et péricardites tuberculeuses sont classiquement décrites dans les semaines ou mois suivant une primo-infection. Cependant, ces atteintes séreuses peuvent être concomitantes d'une tuberculose pulmonaire active ou d'une miliaire. L'épanchement pleural, souvent peu abondant, se caractérise par un exsudat à prédominance lymphocytaire, parfois hématique. L'isolement du BK est relativement rare (environ 30 %). Une biopsie pleurale peut mettre en évidence des granulomes et permettre l'isolement du bacille.
La péritonite tuberculeuse résulte soit d'une contiguïté avec un organe infecté (adénopathie, intestin, salpingite), soit par dissémination lors d'une forme miliaire. Le liquide d'ascite est un exsudat contenant de 500 à 2 000 cellules/mm^3, à prédominance lymphocytaire le plus souvent.

1.4.4. Tuberculoses neuroméningées

La méningite tuberculeuse se présente sous la forme d'une méningite d'installation plutôt progressive sur quelques semaines, isolée, ou associée à des signes neurologiques focaux, avec en particulier une atteinte évocatrice de la base du crâne. Une hyponatrémie par sécrétion inappropriée d'hormone antidiurétique est habituelle. Une autre atteinte tuberculeuse concomitante suggère le diagnostic, mais n'est pas systématique. L'orientation diagnostique est principalement donnée par l'analyse du LCR qui est souvent à prédominance lymphocytaire et hypoglycorachique avec une hyperprotéinorachie franche. L'isolement du BK à partir du LCR est relativement rare. Des tuberculomes intracérébraux peuvent accentuer les troubles neurologiques ou psychiatriques, ou se manifester par des crises convulsives. Des troubles de la circulation du LCR peuvent conduire à une hydrocéphalie, pouvant nécessiter le recours à des évacuations itératives de LCR, voire à la pose d'une valve de dérivation ventriculopéritonéale.

1.4.5. Tuberculoses urogénitales

Une tuberculose rénale peut survenir quelle que soit la forme de tuberculose. Souvent, est retrouvée de façon concomitante une localisation pulmonaire qui n'est pas nécessairement active. La pyurie aseptique est évocatrice et l'urographie objective habituellement des anomalies, d'autant plus importantes que l'évolution de l'infection est prolongée : modifications des structures

urinaires qui paraissent rétrécies, rigides, avec une moindre capacité à se déformer, des calcifications suggestives, une hydronéphrose. La recherche de mycobactéries sur les urines, prélevées le matin, trois jours de suite, et leur mise en culture, permet le diagnostic dans la majorité des cas. Si une obstruction se développe, une corticothérapie, adjuvante au traitement antibiotique, peut permettre la levée de l'obstacle. En l'absence d'amélioration ou en cas de complication, le recours à la chirurgie peut être nécessaire.
Chez l'homme, une atteinte génitale est fréquemment associée à l'atteinte rénale, pouvant impliquer la prostate, les vésicules séminales, les épididymes et les testicules. Le diagnostic est suggéré par la mise en évidence de calcifications repérables à l'examen clinique. Chez la femme, la tuberculose génitale débute par une salpingite, à partir de laquelle l'infection peut progresser vers les autres organes génitaux, et provoquer une stérilité.

1.4.6. Tuberculose digestive

La contamination du tube digestif se fait par la déglutition de sécrétions contaminées. L'ensemble du tube digestif peut être impliqué, depuis la bouche jusqu'à l'anus, sous forme d'ulcérations ou de masse d'allure tumorale exubérante pouvant faire dévier le diagnostic. L'évolution peut se faire vers des complications telles qu'une hémorragie, une perforation, une obstruction, une fistulisation et des troubles sévères de malabsorption. La réponse au traitement antibiotique est excellente et doit laisser si possible le délai nécessaire à son évaluation avant tout recours à la chirurgie.
Des tuberculoses pancréatiques existent sous un aspect d'abcès ou de masse, impliquant aussi des ganglions, qui peuvent à tort orienter vers une tumeur. Par ailleurs, les voies biliaires peuvent être obstruées par des adénopathies tuberculeuses contiguës, et des cholangites tuberculeuses ascendantes ont été aussi décrites.
La tuberculose est une cause fréquente d'hépatite granulomateuse, habituellement asymptomatique, ou du moins associée à une élévation isolée des phosphatases alcalines.

1.4.7. Autres formes, rares

La tuberculose laryngée hautement contagieuse peut se présenter sous la forme d'une lésion allant d'un simple érythème jusqu'à l'ulcération et un aspect de masse exubérante pseudotumorale.
L'otite tuberculeuse est rare et son diagnostic fait fréquemment défaut par l'absence de manifestations spécifiques (otorrhée indolore, perforations tympaniques). Cependant, l'infection évolue progressivement vers une perte auditive sévère, une nécrose de l'os mastoïde et une paralysie faciale.
Une atteinte tuberculeuse des glandes surrénales peut provoquer une hypertrophie des glandes avec ou sans calcifications, et être responsable d'une insuffisance surrénale lente.
Différentes atteintes oculaires tuberculeuses ont été décrites, requérant un examen ophtalmologique systématique devant toute tuberculose : les tubercules de Bouchut rétiniens parfois retrouvés lors d'une miliaire, uvéite, épisclérite.
Des lésions tuberculeuses cutanées variées ont été décrites, surtout par le passé. Il peut s'agir d'une inoculation exogène, de l'extension d'un foyer adjacent

(ganglions, os) ou d'une dissémination hématogène. La variabilité de ces lésions, nodulaires ou ulcérées, doit inciter à rechercher une mycobactérie, surtout en l'absence d'étiologie clairement identifiée et particulièrement en cas de sida.

2. Traitement

Le traitement de la tuberculose doit être actif sur les bacilles extra- mais aussi intracellulaires. Il comporte toujours une association de plusieurs antibiotiques afin de prévenir la sélection de mutants résistants. Les antituberculeux se prennent une fois par jour, à distance des repas (une demi-heure avant ou deux heures après).

2.1. Traitement de référence

Le traitement de référence dure six mois. À la phase d'attaque initiale, on associe quatre antibiotiques pendant deux mois : l'isoniazide (INH 4 $mg{\cdot}kg^{-1}{\cdot}j^{-1}$), la rifampicine (RMP 10 $mg{\cdot}kg^{-1}{\cdot}j^{-1}$), le pyrazinamide (PZA 20 $mg{\cdot}kg^{-1}{\cdot}j^{-1}$) et l'éthambutol (EMB 15 $mg{\cdot}kg^{-1}{\cdot}j^{-1}$) (Tableau 3.1). Cette association antibiotique initiale est recommandée en traitement de première intention, pour toute tuberculose, quelle que soit l'atteinte organique et hors de tout contexte de suspicion de multirésistance. Il est à noter que *M. bovis* présente une résistance naturelle au pyrazinamide. À la phase d'entretien, si possible après l'obtention des résultats de l'antibiogramme, deux antibiotiques sont maintenus pendant les quatre mois suivants : INH et RMP.
Pour améliorer l'observance et éviter le développement de bacilles résistants, il faut privilégier les associations fixes de médicaments combinés sous une seule forme galénique : Rifater® : INH + RMP + PZA (1 comprimé/12 kg de poids) ; Rifinah® : INH + RMP (1 comprimé : 150 mg d'INH + 300 mg de RMP).
En cas de doute sur l'observance, l'OMS recommande le traitement supervisé (DOT = *directly observed therapy*), au cours duquel la prise des médicaments est contrôlée par un agent de santé, avec des schémas de prises plurihebdomadaires. La durée du traitement doit, dans certains cas, être allongée au-delà de six mois : absence de PZA (neuf mois), tuberculose osseuse ou neuroméningée (neuf à douze mois), résistance ou intolérance ou mauvaise observance (jusqu'à plus de un an après la négativation des cultures de crachats).

2.2. Surveillance du traitement

Le bilan initial doit comporter une créatininémie, un bilan hépatique et un examen du fond d'œil. Le bilan hépatique doit être contrôlé régulièrement (ex : à j7, j14 puis une fois par mois) (Tableau 3.2). La RMP seule est rarement hépatotoxique. Le risque d'hépatite sous INH est majoré par l'association avec la RMP.

Tableau 3.1
Antituberculeux de référence

Médicaments	Posologie quotidienne adulte	Posologie hebdomadaire « DOT »*	Effets indésirables	Remarques
Isoniazide (INH)	4 mg·kg^{-1}·j^{-1} PO ou IV (enfant : 10 mg·kg^{-1}·j^{-1}) Max–300 mg 5 mg·kg^{-1}·j^{-1} si non associé à RMP	15 mg·kg^{-1}·sem^{-1} PO ou IV Max–900 mg	Hépatite**, polynévrite, algodystrophie, troubles psychiques, amaigrissement	Risque d'hépatite majoré avec l'âge et l'alcool Polynévrite rare, pyridoxine (50 mg/j) surtout si diabète, VIH, malnutrition, grossesse
Rifampicine (RMP)	10 mg·kg^{-1}·j^{-1} PO ou IV Max–600 mg	10 mg·kg^{-1}·sem^{-1} PO ou IV Max–600 mg	Coloration orangée des urines et des sécrétions, nausées, vomissements, hépatite**, fièvre, allergie, hémolyse, thrombopénie	Interactions : anticoagulants oraux, hypoglycémiants oraux, corticoïdes, œstrogènes, ketoconazole, anti-VIH, ciclosporine, digitaliques, phénytoïne...
Éthambutol (EMB)	15–20 mg·kg^{-1}·j^{-1} PO ou IV Max–2,5 mg	50 mg/kg × 2/sem PO ou IV 25–30 mg/kg × 3/sem PO ou IV	Névrite optique rétrobulbaire, nausées, vomissements, céphalées, vertiges, allergie cutanée	Surveiller le champ visuel et toute modification de la vision
Pyrazinamide (PZA)	15–30 mg·kg^{-1}·j^{-1} PO Max–2 g	50–70 mg·kg^{-1}·sem^{-1} PO Max–4 g × 2/sem Max–3 g × 3/sem	Hépatite** (dose-dépendante), hyperuricémie, arthralgies, fièvre, nausées, vomissements, phototoxicité, allergie cutanée	Hyperuricémie habituelle, goutte rare Arthralgies contrôlées par aspirine

PO : per os ; IV : intraveineux ; IM : intramusculaire.
*DOT : *directly observed therapy* ; **Tout patient recevant isoniazide, rifampicine et/ou pyrazinamide doit consulter en cas de symptôme évocateur d'hépatite : anorexie, nausées, vomissements, ictère, malaise général, fièvre de plus de trois jours, douleurs abdominales.

Tableau 3.2
Surveillance minimale du traitement d'une tuberculose pulmonaire

	Initial	j0 – j15	j30	M2	M4	M6	M9	M12
Consultation	•	•	•	•	•	•	•	•
Bactériologie	•	◆		• Si expectoration		• Si expectoration		
Radio thorax	•	•	•	•	•	•	•	•
Transaminases	•	•	•	• Si anomalie				
Uricémie	•							
Examen ophtalmologique	•	• Si éthambutol	• Si éthambutol					
Créatininémie	•							

* L'examen bactériologique précoce entre le 10e et le 15e jour de traitement est indiqué chez les malades hospitalisés en isolement afin de vérifier la négativation de l'examen microscopique direct.

L'observance doit être vérifiée tout au long du traitement. L'efficacité du traitement s'apprécie devant une amélioration clinique avec apyrexie, amélioration de l'état général dont une reprise de poids. La radiographie pulmonaire s'améliore progressivement mais il peut persister des images de séquelles. Il faut contrôler régulièrement les crachats avec examen direct et culture. Des BAAR peuvent persister à l'examen direct pendant quelques jours à quelques semaines, malgré l'efficacité du traitement. L'absence d'amélioration clinique rapide et la persistance de BAAR en grande quantité doit faire évoquer une mauvaise observance ou une résistance.

2.3. Corticothérapie

Une corticothérapie initiale (prednisone 0,5 à 1 mg$\cdot$kg$^{-1}\cdot$j^{-1}) peut être indiquée le premier mois du traitement en cas de miliaire asphyxiante ou de pleurésie sévère. Certaines localisations extrapulmonaires associées peuvent justifier une corticothérapie : péricardite, méningite, pancytopénie, péritonite sévère d'évolution prolongée, volumineuses adénopathies, l'altération majeure de l'état général, et l'état de choc tuberculeux. La RMP inactive environ un tiers du corticoïde.

2.4. Tuberculose multirésistante

Une tuberculose est dite multirésistante lorsqu'il existe au minimum une résistance à l'INH et la RMP. Tout malade suspect ou confirmé d'être dans cette situation doit impérativement être strictement isolé et confié à un spécialiste.

L'antibiogramme doit être vérifié dans un centre de référence. Le principe du traitement est d'associer au moins trois ou quatre médicaments, actifs d'après les données de l'antibiogramme, pour une durée très prolongée (≥ 18 mois). Des antituberculeux de deuxième ligne (Tableau 3.3) sont responsables de nombreux effets secondaires rendant la réalisation du traitement très difficile. L'observance doit être vérifiée en permanence.

Tableau 3.3
Antituberculeux de seconde ligne

Médicaments	Posologie quotidienne	Effets indésirables	Remarques
Amikacine	10 mg·kg^{-1}·j^{-1} IV ou IM	Toxicité auditive, vestibulaire et rénale	Audiométrie de référence, surveillance fonction rénale, K^+, Ca^{++} et Mg^{++}/sem
Capréomycine	15 mg·kg^{-1}·j^{-1} intramusculaire Max–1 g	Toxicité auditive, vestibulaire et rénale	Audiométrie de référence + 1/mois, surveillance fonctions vestibulaire et rénale
Kanamycine	15 mg·kg^{-}·j^{-1} IV ou IM Max–1 g	Toxicité auditive, vestibulaire et rénale	Audiométrie de référence + 1/mois, surveillance fonctions vestibulaire et rénale
Ciprofloxacine	500–750 mg × 2/j PO	Nausées, vomissements, photosensibilisation	Ofloxacine (300–400 mg × 2/j) et lévofloxacine (500 mg × 2/j) Aussi efficaces
Clofazimine	100–200 mg/j PO	Nausées, vomissements, pigmentation, ichtyose	Dépots organiques de cristaux de clofazimine, syndrôme abdominal douloureux
Cyclosérine	250–500 mg × 2/j PO 15–20 mg·kg^{-1}·j^{-1} Max–1 g	Troubles psychiatriques, convulsions, allergie	Évaluation psychiatrique préalable, pyridoxine (50 mg/250mg cycloserine)
Ethionamide	250–500 mg × 2/j PO 15–20 mg·kg^{-1}·j^{-1}	Nausées, vomissements, hépatite, photosensibilisation, arthralgies, goût métallique	Surveiller bilan hépatique
PAS	4–6 g × 2/j PO 150 mg·kg^{-1}·j^{-1}	Nausées, vomissements, hépatite, allergie	
Streptomycine	15 mg·kg^{-1}·j^{-1} IM Max–1 g	Ototoxicité et possible néphrotoxicité	Diminuer la dose si insuffisance rénale

PO : per os ; IV : intraveineux ; IM : intramusculaire.

2.5. Circonstances particulières

Des circonstances particulières nécessitent parfois une adaptation.

2.5.1. Tuberculose et infection à VIH

Un diagnostic de tuberculose doit toujours faire évoquer et dépister une infection par le VIH associée. La réponse au traitement antituberculeux ne semble pas différente chez les patients infectés par le VIH. Un schéma thérapeutique de six mois est préconisé dans le cas de tuberculose à bacille sensible. Le risque d'interactions avec les antirétroviraux, surtout entre les inhibiteurs de la protéase et la rifampicine, obligent soit à surseoir au traitement antirétroviral, soit à adapter les posologies au cas par cas selon les variations des concentrations déjà connues et sous le contrôle des taux sériques. Dans la famille des rifamycines, la rifabutine présente moins d'interactions que la rifampicine et peut servir d'alternative avec vigilance. Le Tableau 3.4 résume les interactions dans ces circonstances.

2.5.2. Tuberculose et grossesse

Pour la femme enceinte, le traitement ne doit être administré qu'en cas de nécessité impérative. L'utilisation du PZA est contre-indiquée.

Tableau 3.4
Recommandations pour la prescription simultanée des antirétroviraux avec la rifabutine ou la rifampicine chez les adultes

Antirétroviraux	Association avec rifabutine	Association avec rifampicine	Remarques
Saquinavir	Possible	Non	Association saquinavir SGC ou saquinavir HGC avec ritonavir, co-prescrit avec – une dose standard de rifampicine (600 mg/j), ou – une dose réduite de rifabutine (150 mg × 2 à 3 fois/sem), possible mais données pharmacocinétiques et cliniques limitées
Ritonavir	Possible	Non	Augmente les concentrations de rifabutine (+350 %), réduire la dose de rifabutine (150 mg/j ou 2 à 3 fois/sem). Rifampicine (600 mg/j ou 2 à 3 fois/sem) possible, mais données pharmacocinétiques et cliniques limitées
Kaletra	Possible	Non	Augmente les concentrations de rifabutine (+ 350 %), réduire la dose de rifabutine (150 mg/j ou 2 à 3 fois/sem). Rifampicine (600 mg/j ou 2 à 3 fois/sem) possible, mais données pharmacocinétiques et cliniques limitées

Suite du tableau page ci-après.

Tableau 3.4 ***(suite)***

Antirétroviraux	Association avec rifabutine	Association avec rifampicine	Remarques
Indinavir	Oui	Non	Augmente les concentrations de rifabutine (+173 %), réduire la dose de rifabutine (150 mg/j) Rifampicine abaisse les concentrations d'indinavir (–92 % contre –34 % avec rifabutine)
Nelfinavir	Oui	Non	Augmente les concentrations de rifabutine (+200 %), réduire la dose de rifabutine (150 mg/j) Rifampicine abaisse les concentrations de nelfinavir (–82 % contre –32 % avec rifabutine)
Amprénavir	Oui	Non	Augmente les concentrations en rifabutine (+200 %), réduire la dose de rifabutine (150 mg/j) Rifampicine abaisse les concentrations d'amprénavir (–82 % contre –15 % avec rifabutine)
Névirapine	Oui	Déconseillée	Rifabutine à dose habituelle (300 mg/j) possible d'après études pharmacocinétiques Rifampicine abaisse les concentrations de névirapine (–58 % contre –16 % avec rifabutine) Association rifampicine et névirapine déconseillée ; à utiliser avec vigilance, seulement en cas d'absolue nécessité Ajustements de dose nécessaires
Délavirdine	Non	Non	Rifampicine et rifabutine abaissent les concentrations de délavirdine (respectivement –80 % et –96 %)
Efavirenz	Possible	Oui	Efavirenz abaisse les concentrations en rifabutine, augmenter la dose de rifabutine (450 ou 600 mg/j) Rifampicine à dose habituelle (600 mg/j) Rifampicine abaisse les concentrations d'efavirenz (–26 % contre –16 % avec rifabutine), augmenter l'efavirenz (800 mg/j)

NB : L'association habituelle des inhibiteurs de protéase avec le ritonavir pour obtenir des concentrations plus élevées de ces produits par effet *booster* (amplificateur) est à prendre en considération car l'adjonction de ritonavir modifie aussi les concentrations de rifabutine.

2.5.3. Tuberculose et insuffisances hépatique et rénale

En cas d'insuffisance hépatique préexistante, l'utilisation simultanée de la RMP, de l'INH et du PZA impose une vigilance accrue. Le PZA n'est pas utilisé en cas d'atteinte hépatique sévère. La dose d'INH peut être adaptée selon les concentrations sériques.
En cas d'insuffisance rénale, les doses de PZA et d'EMB sont à adapter.

3. Prévention

3.1. Isolement respiratoire

La transmission de bacilles tuberculeux se fait par voie aérienne, imposant des mesures de prévention. Elles doivent être appliquées au mieux pour limiter la propagation de la maladie, adaptées selon les possibilités d'organisation des soins et selon le contexte socio-environnemental du patient.
Tout malade suspect de tuberculose pulmonaire bacillifère doit être isolé en chambre individuelle, porte fermée, après information explicite sur les raisons de cet isolement. Les sorties de la chambre doivent être limitées au strict minimum pour la nécessité de réalisation des examens indispensables. Le port d'un masque de protection respiratoire, de type chirurgical (masque FFP1 selon la norme de classification européenne EN149), est avisé lors des déplacements du malade hors de la chambre. Le personnel soignant et les visiteurs doivent porter le même type de masque protecteur lors des soins et des visites auprès du malade. Les visites de sujets immunodéprimés doivent être évitées. Les mesures d'isolement respiratoire sont à maintenir jusqu'à l'obtention de signes objectifs d'amélioration clinique, et jusqu'à la disparition ou la nette réduction de la concentration de BAAR à l'examen direct des crachats.

3.2. Mesures annexes

La tuberculose active mise sous traitement curatif est une maladie à déclaration obligatoire (DO), y compris en l'absence de preuve bactériologique. La DO doit être effectuée sur un imprimé spécifique, par le médecin, auprès de la DDASS (Direction départementale des affaires sanitaires et sociales). Cette DO permet de suivre l'épidémiologie de la maladie et d'engager les investigations pour le dépistage de cas de tuberculoses associés.
L'enquête autour d'un cas fait partie intégrale du traitement. Il s'agit de rechercher les cas secondaires ou le cas index dans l'entourage de la (des) personne(s) mise(s) sous traitement. Cette enquête est assurée par les services de lutte antituberculeuse du département (Conseil général), à la demande du médecin traitant qui doit le préciser sur l'imprimé de DO. Elle peut être demandée par le signalement de la maladie au Conseil général. L'entourage d'un malade atteint d'une tuberculose bacillifère doit faire l'objet d'une enquête systématique avec examen clinique, IDR à la tuberculine et radiographie pulmonaire. Si l'IDR est négative, elle doit être refaite trois mois plus tard afin de dépister un virage correspondant à une variation d'au moins 10 mm entre les deux tests (voir supra).

Les personnes sous traitement pour une tuberculose active ont accès à une prise en charge à 100 % (affection de longue durée) par la Sécurité sociale qui doit être demandée par le médecin auprès de la Caisse primaire d'assurance maladie. En l'absence de couverture sociale, il est possible de faire une demande de couverture médicale universelle (CMU) et d'avoir recours aux dispensaires antituberculeux pour la mise à disposition gratuite du traitement.

3.3. Chimioprophylaxie

La chimioprophylaxie est le traitement de l'infection tuberculeuse asymptomatique, indiquée en l'absence de tuberculose active. L'indication majeure est l'enfant ayant été en contact étroit avec un tuberculeux bacillifère. Elle se discute au cas par cas pour d'autres indications potentielles (IDR ≥ 10 mm, antécédent de PIT non traitée, corticothérapie, immunodépression). Elle repose sur l'un des deux schémas suivants : INH (5 $mg{\cdot}kg^{-1}{\cdot}j^{-1}$) pendant six mois ou INH (4 $mg{\cdot}kg^{-1}{\cdot}j^{-1}$) + RMP (10 $mg{\cdot}kg^{-1}{\cdot}j^{-1}$) pendant trois mois.

3.4. BCG

Le bacille de Calmette et Guérin vaccinal (BCG) est une souche vivante atténuée de *M. bovis*. Le BCG protège l'enfant à 80 % des formes graves de tuberculose (miliaire, méningite) et à environ 50 % de la tuberculose pulmonaire commune. Il est indiqué chez les enfants n'ayant pas fait de PIT (IDR négative). Le BCG est contre-indiqué en cas d'immunodépression ou de maladie évolutive. La technique de référence est l'injection intradermique (voir le chapitre Vaccination page 257).

Pour en savoir plus

Maladie tuberculeuse. Rev Prat 2002 ; 52 : 2103-53.

Tuberculose : une maladie toujours d'actualité. 45e journée de l'hôpital Claude-Bernard. Paris : EDK ; 2002.

Billy C, Perronne C. Traitement de la tuberculose sensible et résistante aux antituberculeux. Ann Med Intern 2002 ; 153 : 119-27.

Bouvet E. Traitement de la tuberculose et organisation des soins. Rev Prat 2002 ; 52 : 2144-50.

Prise en charge des personnes infectées par le VIH. Rapport 2002. Recommandations du groupe d'experts. Paris : Médecine-Sciences Flammarion ; 2002.

Groupe de travail du Conseil supérieur d'hygiène publique de France. Prévention et prise en charge de la tuberculose en France. Rev Mal Respir 2003 ; 20 : 7S1-7S106 (disponible sur le site internet www.sante.gouv.fr).

Le bacille tuberculeux et sa pathologie. XXe colloque, Paris, 21 mars 2003. Med Mal Infect 2003 ; 33 suppl 3 (numéro spécial) : 123s-192s.

Mycobacterium tuberculosis et mycobactéries atypiques

Chapitre 4

Aspects cliniques et thérapeutiques des infections à mycobactéries atypiques chez l'adulte

Christophe Billy, Christian Perronne

Les infections à mycobactéries non tuberculeuses ou mycobactéries atypiques prennent une place grandissante en pathologie infectieuse. Alors que les premières mycobactéries atypiques ont été mises en évidence peu de temps après la découverte du bacille tuberculeux, leur rôle pathogène pour l'homme ne fut reconnu qu'à partir de la deuxième moitié du XX[e] siècle. La plupart de ces micro-organismes ont été isolés de l'eau et du sol. Les mycobactéries les mieux connues et les plus fréquentes sont *Mycobacterium* complexe *avium* (*M. avium, M. intracellulare*) particulièrement retrouvées dans les infections liées à l'épidémie de sida. Pour nombre de mycobactéries atypiques, leur milieu de prédilection et leur réservoir de diffusion est l'environnement aqueux : *M. marinum, M. kansasii, M. xenopi, M. simiae, M. fortuitum, M. chelonae, M. abscessus, M. malmoense, M. ulcerans*. D'autres, mises en évidence plus récemment, sont moins bien connues : *M. ulcerans, M. haemophilum, M. szulgai, M. celatum, M. conspicuum, M. genavense*. La contamination est donc principalement d'origine environnementale. Mais il est possible que la transmission par voie aérienne joue un rôle dans les infections respiratoires dues à ces germes. En revanche, la contamination digestive est la source principale d'infection pour les enfants et les personnes atteintes du sida, avec une dissémination secondaire pouvant impliquer de nombreux organes. L'inoculation directe est également une source de contamination potentielle à l'origine d'infection des parties molles.

L'infection pulmonaire chronique est la localisation la plus fréquente, pour laquelle *Mycobacterium* complexe *avium* est majoritairement en cause, suivie par *M. xenopi* et *M. kansasii*. D'autres telles que *M. abscessus, M. fortuitum, M. szulgai, M. simiae, M. malmoense, M. celatum, M. asiaticum, M. shimodii* sont plus occasionnelles. La corrélation entre les résultats des prélèvements microbiologiques et les diverses manifestations cliniques est difficile à établir, en particulier pour les patients atteints du sida (Tableau 4.1).

Les recommandations thérapeutiques des infections à mycobactéries atypiques non soumises à un traitement préalable se basent essentiellement sur la connaissance des sensibilités in vitro de chaque espèce vis-à-vis des antibiotiques. Ainsi, pour tout patient, porteur supposé ou confirmé d'une infection à mycobactéries atypiques, il est nécessaire de prendre en compte ses antécédents thérapeutiques afin d'adapter le choix du traitement initial. Si une mycobactérie spécifique est isolée, il est recommandé de réaliser un antibiogramme de façon systématique et d'adresser la souche à un centre de référence. Au mieux il est préférable de déterminer les concentrations minimales inhibitrices de l'espèce isolée car, excepté pour *M. kansasii*, l'antibiogramme classique est souvent peu fiable. Dans l'attente de ces informations, le choix du traitement initial doit comporter une polychimiothérapie dont les associations permettent la couverture des mycobactéries atypiques les plus fréquentes (Tableau 4.2).

Les infections à mycobactéries atypiques à localisation pulmonaire ou disséminées posent des problèmes diagnostiques et thérapeutiques. Ces infections augmentent la mortalité en particulier chez les sujets immunodéprimés atteints de sida, d'autant plus lors des formes disséminées. Les difficultés pour distinguer la colonisation de l'infection évolutive, pour poser les indications thérapeutiques et gérer les associations médicamenteuses, doivent inciter à une prise en charge des patients au sein d'équipes médicales spécialisées.

Tableau 4.1
Mycobactéries atypiques pouvant provoquer des infections chez l'être humain, classées selon leur mode de présentation clinique

Type d'infection	Mycobactéries habituellement responsables	Caractéristiques morphologiques prédominantes	Mycobactéries autres pouvant être en cause
Pulmonaire	*M.* complexe *avium*	Croissance lente (> 7 j) ; non pigmentée	*M. simiae* *M. szulgai*
	M. kansasii	Pigmentée	*M. fortuitum*
	M. abscessus	Croissance rapide ; non pigmentée	*M. celatum* *M. asiaticum*
	M. xenopi	Croissance lente ; pigmentée	*M. shimodii*
	M. malmoense	Croissance lente ; non pigmentée	*M. haemophilum* *M. smegmatis*
Ganglionnaire	*M.* complexe *avium*	Non pigmentée	*M. fortuitum*
	M. scrofulaceum	Pigmentée	*M. chelonae*
	M. malmoense	Croissance lente	*M. abscessus* *M. kansasii* *M. haemophilum*
Cutanée	*M. marinum*	Photochromogène ; isolement à température basse (28–30 °C)	*M.* complexe *avium* *M. kansasii*
	M. fortuitum	Non pigmentée ; croissance rapide	*M. nonchromogenicum* *M. smegmatis*
	M. chelonae		*M. haemophilum*
	M. abscessus		
	M. ulcerans	Pigmentée ; croissance lente	
Disséminée	*M.* complexe *avium*	Pigmentée (80 %)	*M. abscessus*
	M. kansasii	Photochromogène	*M. xenopi*
	M. chelonae	Non pigmentée	*M. malmoense*
	M. haemophilum	Non pigmentée	*M. genavense* *M. simiae* *M. conspicuum* *M. marinum* *M. fortuitum*

1. Présentations cliniques

1.1. Formes pulmonaires

Les manifestations pulmonaires sont les plus fréquentes des formes cliniques symptomatiques des infections à mycobactéries atypiques, touchant en général plutôt des personnes âgées avec une maladie pulmonaire chronique préexistante (bronchopathie chronique obstructive post-tabagique, dilatation des bronches, antécédent d'infection à mycobactéries y compris tuberculose,

Tableau 4.2
Antibiotiques à considérer pour les tests de sensibilité in vitro selon les espèces de mycobactéries atypiques

Types de mycobactéries atypiques	Antibiotiques d'efficacité prouvée	Antibiotiques d'efficacité possible	Antibiotiques inefficaces
	Mycobactéries à croissance lente		
M. complexe *avium*	Clarithromycine	Amikacine Ciprofloxacine Éthambutol Éthionamide Rifabutine Rifampicine Streptomycine	Isoniazide Pyrazinamide
M. kansasii	Rifampicine	Amikacine Ciprofloxacine Clarithromycine Éthambutol Isoniazide Rifabutine Streptomycine	Pyrazinamide
M. marinum	Doxycycline ou minocycline Éthambutol Rifampicine Cotrimoxazole	Amikacine Ciprofloxacine Clarithromycine Rifabutine	Isoniazide Pyrazinamide
	Autres mycobactéries à croissance lente		
M. haemophilum *M. malmoense* *M. simiae* *M. szulgai* *M. xenopi*	Clarithromycine Éthambutol Rifampicine	Amikacine Ciprofloxacine Isoniazide Rifabutine Streptomycine	Pyrazinamide
	Mycobactéries à croissance rapide		
M. abscessus *M. chelonae* *M. fortuitum* *M. mucogenicum* *M. smegmatis*	Amikacine Céfoxitine Ciprofloxacine Clarithromycine Doxycycline ou minocycline Cotrimoxazole	Imipénème Ofloxacine Tobramycine	Clofazimine Éthambutol Isoniazide Pyrazinamide Rifampicine Streptomycine

fibrose pulmonaire, pneumoconiose). Il s'agit en priorité de *Mycobacterium* complexe *avium* (MAC), *M. xenopi*, *M. kansasii* et *M. malmoense*, mais d'autres espèces peuvent être en cause.
Les symptômes pulmonaires sont variables et sans spécificité : toux, expectoration, asthénie. Plus rarement, mais surtout lorsque la maladie est à un état

évolutif avancé, il peut aussi exister une altération de l'état général avec amaigrissement et asthénie, une fièvre, une dyspnée et une hémoptysie. La présentation clinique peut donc ressembler à une tuberculose.
Chez les patients immunodéprimés, la pathogénicité des mycobactéries atypiques est encore plus délicate à affirmer en l'absence de corrélation fréquente entre la clinique et la bactériologie. En particulier, dans le contexte de l'infection par le VIH, une infection à mycobactérie atypique est d'autant plus à suspecter que les lymphocytes $CD4^+$ sont bas (< 100/mm^3).
Il n'existe pas de test diagnostique cutané spécifique, mais l'intradermoréaction cutanée à la tuberculine peut être faiblement positive sous l'influence de contacts avec des mycobactéries atypiques. Dans ces conditions, pour établir le diagnostic, il est essentiel de combiner aux critères cliniques les examens radiographiques et tomodensitométriques ainsi que les examens microbiologiques pour isoler le germe. Il est nécessaire de réaliser une analyse des expectorations obtenues le matin à jeun trois jours de suite, pour un examen direct à la recherche de BAAR (bacilles acido-alcoolo-résistants) et une mise en culture. L'aspiration bronchique, validée pour le diagnostic de la tuberculose, est considérée comme étant également plus sensible que l'examen d'expectoration pour les mycobactéries atypiques.
La présence fréquente des mycobactéries atypiques dans l'environnement rend difficile l'interprétation de leur isolement, pour différencier la colonisation, simple contamination et leur pathogénicité directe, responsable d'une maladie évolutive. C'est le cas en particulier des sujets insuffisants respiratoires chroniques qui peuvent être porteurs sans caractère pathologique. Cependant, la colonisation, stricto sensu, sans aucune invasion tissulaire est probablement très rare. La colonisation bronchique très fréquemment retrouvée sur un patient porteur d'une pathologie respiratoire préexistante, par exemple en cas de mucoviscidose (*M. avium*, *M. abscessus*, etc.), peut évoluer vers l'infection parenchymateuse.
Sur un plan radiographique, il est souvent retrouvé des lésions multifocales associant des dilatations bronchiques et des petits nodules pulmonaires (< 5 mm) repérables en coupes fines tomodensitométriques, en particulier dans les champs pulmonaires moyens et inférieurs. Par comparaison avec la tuberculose, en cas de lésions excavées, les parois des cavernes sont plus fines et avec moins d'infiltrat en périphérie. La progression des infiltrats se fait moins selon une répartition bronchogénique que par contiguïté. L'atteinte pleurale est plus fréquente et s'étend davantage au-delà de la seule zone parenchymateuse concernée en cas d'excavation. En revanche, l'atteinte pleurale et l'épanchement pleural sont rares dans les autres cas. Les images pneumoniques, ou avec un nodule plein isolé, sont rares.
En l'absence de confirmation bactériologique ou de lésions radiographiques évocatrices, il peut être nécessaire de réaliser un biopsie pulmonaire pour recherche de bacilles et pour une analyse histopathologique à la recherche d'un granulome. En l'absence d'argument en faveur d'une autre pathologie pulmonaire, il faut interpréter les éléments positifs cliniques, radiologiques et microbiologiques compatibles pour affirmer une infection à mycobactérie atypique.

1.2. Formes ganglionnaires

Contrairement aux enfants, les adultes présentent très rarement des adénopathies liées à une infection à des mycobactéries atypiques en dehors de toute infection par le VIH. La présentation est alors insidieuse, parfois associée à des symptômes généraux. L'argument diagnostique optimal consiste en l'isolement du bacille en cause à partir d'un prélèvement par cytoponction du ganglion à l'aiguille fine. Une simple biopsie ou incision avec drainage étaient à éviter compte tenu du risque ultérieur de fistulisation chronique, à l'époque où l'on ne disposait pas de traitement médicamenteux efficace. Cette notion semble obsolète actuellement.

1.3. Infections cutanées et des parties molles

Toutes les mycobactéries atypiques sont susceptibles d'être à l'origine d'infections des tissus cutanés ou sous-cutanés, les plus fréquemment retrouvées étant *M. fortuitum, M. abscessus, M. marinum, M. ulcerans* et *M. chelonae*. Ces infections peuvent survenir par inoculation à l'occasion de blessures minimes, comme lors de traumatismes plus importants avec effraction et délabrement des parties molles ou fracture ouverte. Des infections nosocomiales des parties molles sont également décrites dans le cadre d'interventions chirurgicales ou sur matériel, qu'il s'agisse d'un cathéter veineux ou de matériel prothétique.

M. marinum est un peu particulier par le contexte habituel d'inoculation. La bactérie pénètre la peau à partir de lésions ou abrasions lors de la fréquentation des eaux de piscine ou lors du nettoyage d'aquarium. Les infections se présentent en général sous la forme d'un granulome unique localisé sur les extrémités des membres, coudes, genoux, dos des mains ou des pieds. Il évolue vers l'ulcération laissant une cicatrice. *M. ulcerans*, surtout responsable d'infections dans certaines régions tropicales, a la particularité de posséder une toxine et peut occasionner des lésions très délabrantes (voir chapitre 6).

Dans ces différentes circonstances, le diagnostic s'établit au mieux par biopsie dirigée pour analyse anatomopathologique et culture microbienne.

1.4. Infections ostéo-articulaires

De la même façon que les infections sur les parties molles (voir supra), les mycobactéries atypiques peuvent provoquer des infections touchant les articulations ou leurs structures adjacentes (tendons, ligaments, synoviale, bourses séreuses) ainsi que l'os : *M. marinum*, *M.* complexe *avium, M. abscessus, M. chelonae, M. kansasii, M.* complexe *terrae, M. fortuitum*. La pénétration se fait le plus souvent par inoculation directe lors de traumatismes avec effraction, lors d'injections ou lors d'incisions chirurgicales. L'évolution de l'infection se déroule plutôt sur un mode chronique indolore. Une origine hématogène est parfois présumée lorsqu'il n'est pas retrouvé de porte d'entrée bien déterminée pour expliquer une localisation rachidienne ou osseuse périphérique. Une épidémie nosocomiale de spondylodiscite à *M. xenopi* a été rapportée en

France. La contamination a été iatrogène par inoculation directe du disque intervertébral à partir de matériel chirurgical rincé dans un liquide désinfectant contaminé.

1.5. Infections disséminées

Les infections disséminées à mycobactéries atypiques surviennent chez les patients infectés par le VIH à un stade avancé de sida, mais aussi au cours d'autres situations d'immunodépression induites telles que les transplantations d'organes, les leucémies, la corticothérapie prolongée, les chimiothérapies, la dénutrition sévère, etc. L'infection se manifeste par une fièvre prolongée d'origine indéterminée associée à des sueurs nocturnes (*M.* complexe *avium*), une altération de l'état général avec amaigrissement, parfois des signes abdomino-digestifs. Chez l'immunodéprimé non-VIH, des manifestations sous forme de nodules ou d'abcès sous-cutanés sont décrits (*M. kansasii, M. chelonae, M. scrofulaceum, M. abscessus* et *M. haemophilum*).

Dans le cadre de l'infection par le VIH, le diagnostic est à suspecter surtout lorsque le taux de lymphocytes $CD4^+$ est inférieur à $50/mm^3$. D'autres complications possibles à ce niveau d'immunodépression peuvent faire errer le diagnostic. De plus, les manifestations cliniques objectivées peuvent être rapportées au stade avancé de la maladie VIH alors qu'il est possible de retrouver des adénopathies abdominales ou rétropéritonéales ainsi qu'une hépatosplénomégalie. D'autres présentations cliniques sont décrites lors du sida, en particulier les localisations pulmonaires lors des infections disséminées à *M. kansasii.*

Sans faire du dépistage à l'aveugle et multiplier les prélèvements inutiles, il faut penser à ce diagnostic et, dans ce cas, s'acharner à isoler la mycobactérie responsable. La mise en évidence du microbe à partir d'un prélèvement en site stérile (biopsie de moelle, hémoculture, biopsie cutanée ou osseuse) affirme le diagnostic. L'isolement de *M.* complexe *avium* dans l'expectoration ou les selles d'un patient VIH ayant moins de 50 $CD4/mm^3$ détermine un risque de développer une infection disséminée dans l'année qui suit, sans pour autant que celle-ci soit précédée d'une atteinte pulmonaire.

Quelle que soit l'origine de l'immunodépression, la mortalité liée à l'infection à mycobactéries dépend de la sévérité de la maladie sous-jacente et de la gravité de l'immunodépression.

2. Principes thérapeutiques des infections à *Mycobacterium* complexe *avium* (MAC)

Les antituberculeux habituels de première ligne sont 10 à 100 fois moins actifs in vitro sur les MAC que sur *M. tuberculosis.* Auparavant, leur utilisation prioritaire conduisait à un échec ou à une récidive fréquents sous traitement médical seul, et souvent à une chirurgie de sauvetage dans les formes pulmonaires. L'utilisation des macrolides récents, tels que la clarithromycine et l'azithromycine, a radicalement changé le pronostic de ces infections. Leur efficacité clinique et microbiologique a été démontrée in vivo, en particulier au cours du

sida. Dans le groupe des rifamycines, la rifabutine a montré une meilleure activité in vitro que la rifampicine sur les MAC. Son efficacité prophylactique a été démontrée vis-à-vis des formes disséminées chez le patient sida. Ainsi, les nouveaux macrolides et la rifabutine constituent à présent la base du traitement de l'infection à MAC.

2.1. En l'absence d'immunodépression

En l'absence d'immunodépression, le traitement recommandé des infections pulmonaires chroniques et des formes disséminées associe la clarithromycine (500 mg × 2/j), l'éthambutol (25 $mg{\cdot}kg^{-1}{\cdot}j^{-1}$ les deux premiers mois, puis 15 $mg{\cdot}kg^{-1}{\cdot}j^{-1}$), la clofazimine (100 à 200 mg/j, puis 50 mg/j lorsque la peau brunit) et l'amikacine (15 mg/kg × 2/sem pendant 2 à 6 mois). Ce traitement est préconisé jusqu'à un an après la négativation des cultures. Une alternative proposée associe la clarithromycine (500 mg × 2/j), l'éthambutol (15 à 25 $mg{\cdot}kg^{-1}{\cdot}j^{-1}$) et la rifabutine (300 mg/j) pour une durée minimale de 24 mois. Le taux de négativation des expectorations atteint 90 % pour cette association. L'association azithromycine (600 mg), éthambutol (25 mg/kg) et rifabutine (600 mg) en une prise trihebdomadaire a montré une efficacité. L'adjonction intermittente de streptomycine, en prise bi- ou trihedomadaire en début de traitement, les deux premiers mois, voire davantage en cas d'atteinte étendue, a montré un intérêt. Cependant, la toxicité auditive, souvent irréversible, de la streptomycine oblige à une grande prudence d'utilisation, sous couvert d'une adaptation de la posologie à l'âge et au poids du patient, ainsi qu'une surveillance étroite.

2.2. Patient immunodéprimé

Chez le patient immunodéprimé ou atteint du sida, le traitement recommandé associe la clarithromycine (500 mg × 2/j) ou l'azithromycine (600 mg/j) à l'éthambutol (15 à 25 $mg{\cdot}kg^{-1}{\cdot}j^{-1}$) et à la rifabutine (300 mg/j). La négativation des cultures est obtenue plus précocement avec la combinaison clarithromycine + éthambutol que azithromycine + éthambutol (médiane à 4,4 semaines versus 16 semaines). Lorsqu'un traitement antirétroviral est entrepris simultanément, les interactions potentielles requièrent une vigilance particulière, surtout en cas d'association comportant des inhibiteurs de protéase, afin de faire les ajustements posologiques nécessaires. Ainsi, la dose de rifabutine peut être diminuée de moitié en cas de prise concomitante d'indinavir. Il est recommandé, en cas d'association, de vérifier les concentrations sériques de rifabutine et des antirétroviraux susceptibles d'interférer.

La résistance in vitro peut apparaître rapidement, estimée à environ 20 % à trois mois parmi des patients traités en monothérapie par la clarithromycine. De plus, les souches de MAC résistantes à la clarithromycine ont une résistance croisée à l'azithromycine. Bien que sans bénéfice microbiologique, l'adjonction de rifabutine semble diminuer le risque d'émergence de résistance à la clarithromycine. La posologie de clarithromycine doit être dans ce cas ajustée, si nécessaire, selon les concentrations sériques, pour éviter un sous-dosage lié à l'interaction avec la rifabutine. L'adjonction de clofazimine n'apporte pas de bénéfice supplémentaire dans ce contexte, alors que son

efficacité a été démontrée comme équivalente à la rifabutine dans une trithérapie comportant en outre clarithromycine + éthambutol.

2.3. Prophylaxie

Au décours d'une évolution favorable, un traitement prophylactique secondaire est indispensable tant que l'immunodépression n'est pas corrigée de façon stable, avec en particulier un taux de lymphocytes T $CD4^+$ supérieur à 200/mm^3. La prophylaxie secondaire se fait par la clarithromycine (prise biquotidienne) ou l'azithromycine (prise hebdomadaire), seuls ou associés à l'éthambutol à dose moindre (15 $mg{\cdot}kg^{-1}{\cdot}j^{-1}$), voire la rifabutine en monothérapie. La prophylaxie primaire des infections disséminées à MAC chez les patients atteints du sida est à réserver aux personnes ayant une infection VIH à un stade avancé, avec un taux de lymphocytes T $CD4^+$ inférieur à 50/mm^3. La rifabutine (300 mg/j), la clarithromycine (500 mg × 2/j) et l'azithromycine (1 200 mg/semaine) ont démontré leur efficacité en monothérapie comme en association. Le choix se fait en faveur du médicament le mieux toléré et ayant le moins d'interactions potentielles. Cette prophylaxie est à initier après avoir éliminé une infection évolutive à mycobactérie tuberculeuse ou non tuberculeuse.

2.4. Échecs

Les échecs au traitement sont fréquents et d'origine multiple : toxicité et intolérance des médicaments, apparition de résistance secondaire, concentrations sériques insuffisantes. Leur fréquence oblige à un monitorage précis et prolongé (Tableau 4.3). Sous traitement standard incluant un macrolide, l'amélioration clinique doit survenir pour tout patient dans un délai de trois à six mois, accompagné d'une négativation des expectorations dans un délai de 12 mois. Le non-respect de ces délais d'évolution doit inciter à accroître la vigilance sur un défaut d'observance, un risque de résistance ou une intolérance au traitement. Un contrôle mensuel des expectorations en cas d'atteinte pulmonaire est souhaitable (recherche de bacilles acido-alcoolo-résistants et culture). Lorsque la négativation des cultures d'expectorations est obtenue, des contrôles réguliers permettent ensuite de dépister une récidive.

En l'absence de réponse clinique au traitement de première intention après deux à quatre semaines, il faut envisager de le consolider par l'adjonction d'un ou plusieurs antibiotiques tels que la ciprofloxacine (750 mg × 2/j), l'ofloxacine (400 mg × 2/j) ou l'amikacine (7,5 à 15 $mg{\cdot}kg^{-1}{\cdot}j^{-1}$), car il existe un risque de développement de résistance précoce. De même, en cas d'intolérance au traitement initial ou d'échec, ces médicaments sont des recours possibles, tout comme la clofazimine, la cyclosérine, l'éthionamide ou la capréomycine, mais avec une toxicité potentielle ou un intérêt non formellement démontré.

2.5. Traitements adjuvants et perspectives

De nouvelles approches thérapeutiques ont été développées telles que l'immunothérapie, pouvant faire appel aux interleukines et à l'interféron gamma,

Tableau 4.3
Effets indésirables et surveillance des antibiotiques utilisés pour le traitement des infections à mycobactéries atypiques

Antibiotiques	Principaux effets indésirables/toxicité	Surveillance/remarques
Isoniazide	Hépatite*, risque majoré avec l'âge et l'alcool Polynévrite, algodystrophie, troubles psychiques, amaigrissement	Bilan hépatique mensuel (stop si AST > 3–5 N) Polynévrite rare, pyridoxine (50 mg/j) surtout si diabète, VIH, malnutrition, grossesse
Éthambutol	Névrite optique rétrobulbaire, nausées, vomissements, céphalées, vertiges, allergie cutanée	Clinique, toute modification de la vision et examen mensuel de vision des couleurs
Rifampicine	Coloration orangée des urines et des sécrétions, nausées, vomissements, hépatite*, fièvre, allergie, hémolyse, thrombopénie	Bilan hépatique mensuel Interactions : anticoagulants oraux, hypoglycémiants oraux, corticoïdes, estrogènes, kétoconazole,anti-VIH, ciclosporine, digitaliques, phénytoïne...
Rifabutine	Coloration orangée des urines et des sécrétions, polymyalgies, polyarthralgies, leucopénie, uvéite antérieure (clarithromycine)	Clinique Hématologie
Amikacine tobramycine, streptomycine	Néphrotoxicité, insuffisance rénale, toxicité cochléovestibulaire, surdité, allergie	Clinique (audition, vertiges), audiométrie, Créatinine, dosages plasmatiques
Éthionamide	Anorexie, nausées, vomissements, douleurs abdominales, diarrhée, hépatite*, neuropathie périphérique, convulsions, troubles du comportement	Clinique, Bilan hépatique mensuel
Cyclosérine	Troubles psychiatriques, convulsions, allergie	Évaluation psychiatrique préalable, pyridoxine (50 mg/250 mg cyclosérine)
Clarithromycine Azithromycine	Nausées, vomissements, diarrhée, hépatite*, toxicité auditive	Clinique Bilan hépatique Interactions (clarithromycine) : corticoïdes, anticonvulsivants, anticoagulants, antirétroviraux, rifampicine, rifabutine...
Ciprofloxacine Ofloxacine	Nausées, vomissements, diarrhée, céphalées, insomnie, convulsions	Clinique
Céfoxitine	Allergie (fièvre, rash, éosinophilie), anémie, leucopénie	Clinique Hématologie

Suite du tableau page ci-après.

Tableau 4.3 ***(suite)***

Antibiotiques	Principaux effets indésirables/toxicité	Surveillance/remarques
Tétracyclines Doxycycline Minocycline	Nausées, vomissements, diarrhée, photosensibilité, rash, vertiges	Clinique
Sulfamides Cotrimoxazole	Nausées, vomissements, diarrhée, anémie, leucopénie, thrombopénie, allergie (fièvre, rash, Stevens-Johnson)	Clinique Hématologie
Clofazimine	Nausées, vomissements, pigmentation cutanée, ichtyose	Dépôts organiques de cristaux de clofazimine (rétine), syndrome abdominal douloureux

*Tout patient recevant isoniazide, rifampicine et/ou pyrazinamide doit consulter en cas de symptôme évocateur d'hépatite : anorexie, nausées, vomissements, ictère, malaise général, fièvre de plus de trois jours, douleurs abdominales.

mais sont d'utilisation actuellement limitée. Des déficits partiels ou complets en récepteurs de l'interféron gamma ou en interleukine 12 ont été décrits comme une prédisposition aux infections à mycobactéries atypiques. Ces observations de sensibilité génétique particulière indiquent la nécessité de traitements immunologiques complémentaires.

De plus, les avancées thérapeutiques réalisées ces dernières années permettent de ne plus envisager la chirurgie comme indispensable pour traiter et prévenir la récidive des infections pulmonaires à MAC. Cependant, la chirurgie de résection pulmonaire est souvent indiquée, en cas de poumon dystrophique, pour la prévention de la sélection de mutants résistants. Elle n'est pas sans risque de morbidité et de mortalité secondaires surajoutées. Les indications doivent en être bien posées et la réalisation assurée par une équipe chirurgicale expérimentée dans ce type de pathologie.

2.6. Localisations extrapulmonaires

Les localisations extrapulmonaires, telles que les infections à MAC ostéo-articulaires, de la peau et des tissus mous, nécessitent souvent une excision chirurgicale et une multithérapie. Dans ces circonstances, l'efficacité réelle ainsi que la durée du traitement ne sont pas formellement déterminées. La durée recommandée s'étend de six à douze mois.

3. Principes thérapeutiques des infections à *Mycobacterium kansasii*

L'atteinte pulmonaire est la forme la plus fréquente des infections à *M. kansasii*.

3.1. Options antibiotiques

M. kansasii est sensible aux antituberculeux classiques tels que la rifampicine, l'isoniazide, l'éthambutol, et également à l'éthionamide, la streptomycine et la clarithromycine, aux doses thérapeutiques habituellement utilisées. Cependant, comparé à *M. tuberculosis*, *M. kansasii* est réputé moins sensible aux antituberculeux. De fait, certaines souches peuvent être déclarées résistantes à l'isoniazide aux concentrations de 0,2 ou 1 µg/ml, et à la streptomycine à 2 µg/ml, nécessitant des concentrations légèrement plus élevées de ces médicaments. La posologie d'isoniazide doit atteindre les 5 $mg{\cdot}kg^{-1}{\cdot}j^{-1}$, en l'absence d'association à la rifampicine. Quel que soit le résultat de l'antibiogramme, l'isoniazide (ou la streptomycine) est à utiliser. Concernant le résultat du test de sensibilité à la rifampicine, il faut s'assurer auprès du laboratoire de l'utilisation de rifampicine et non de rifamycine SV à laquelle *M. kansasii* est naturellement résistant. Les autres produits efficaces in vitro sont la clarithromycine, le cotrimoxazole, l'amikacine, les fluoroquinolones et la rifabutine. En revanche, les souches de *M. kansasii* sont résistantes aux concentrations habituelles de pyrazinamide, du PAS (acide p-aminosalicylique) et de capréomycine. Des résistances acquises à l'isoniazide, la rifampicine et l'éthambutol ont été décrites pour des souches provenant d'échec de traitement.

3.2. Orientations thérapeutiques

Il n'existe pas d'étude randomisée comparant différents traitements ou l'absence de traitement de *M. kansasii*. Cependant, compte tenu de l'évolution spontanée défavorable de l'infection pulmonaire à *M. kansasii*, le traitement est recommandé. Les orientations thérapeutiques reposent sur plusieurs études rétrospectives et prospectives évaluant différents traitements. L'adjonction de rifampicine dans le cadre de multithérapies a considérablement modifié le pronostic de l'infection permettant l'obtention d'une négativation des crachats dans 100 % des cas et un taux de rechute extrêmement faible (incidence < 1,1 %).

En l'absence de traitement court ou intermittent suffisamment évalué, le régime thérapeutique standard recommandé pour l'adulte est l'association isoniazide (4 $mg{\cdot}kg^{-1}{\cdot}j^{-1}$), rifampicine (10 $mg{\cdot}kg^{-1}{\cdot}j^{-1}$) et éthambutol (25 $mg{\cdot}kg^{-1}{\cdot}j^{-1}$ pour les deux premiers mois puis 15 $mg{\cdot}kg^{-1}{\cdot}j^{-1}$) pendant 18 mois dont au moins 12 mois après négativation des cultures d'expectoration. En cas d'intolérance ou de résistance secondaire à la rifampicine, une bithérapie à fortes doses peut être proposée, comprenant isoniazide (10 $mg{\cdot}kg^{-1}{\cdot}j^{-1}$, maximum 900 mg/j) et éthambutol (25 $mg{\cdot}kg^{-1}{\cdot}j^{-1}$), en association avec le cotrimoxazole à raison de 3 grammes par jour de sulfaméthoxazole, pour une durée de 12 à 15 mois après négativation des expectorations. Le test de sensibilité de *M. kansasii* vis-à-vis de la rifampicine peut orienter le choix thérapeutique, alors que ceux concernant l'isoniazide et la streptomycine peuvent induire en erreur. En règle générale, si l'un des médicaments du régime standard ne peut être administré ou est arrêté pour intolérance, la clarithromycine est une alternative raisonnable compte tenu de son activité in vitro. Mais son efficacité n'a

pas été formellement démontrée et des résistances existent. En revanche, la résistance naturelle de *M. kansasii* au pyrazinamide rend inutile l'adjonction de ce médicament. L'amikacine ou la streptomycine peuvent être utiles en traitement intermittent de seconde ligne sur plusieurs mois, mais avec la contrainte de la voie injectable et un risque important de toxicité nécessitant une surveillance stricte. Les fluoroquinolones sont actives in vitro mais non étudiées in vivo.

3.3. Formes extrapulmonaires

Les principes de traitement des formes extrapulmonaires sont identiques. Des formes disséminées ont été décrites au cours du sida avec un pronostic sévère. Dans le contexte spécifique de l'infection par le VIH, l'utilisation d'inhibiteurs de protéase rend plus complexe la réalisation du traitement de *M. kansasii* du fait des interactions avec la rifampicine. En cas de nécessité à maintenir les inhibiteurs de protéases, il est souhaitable de remplacer la rifampicine par la clarithromycine ou la rifabutine. Ces adaptations du régime standard semblent donner de bons résultats mais, en l'absence d'étude, il convient d'être prudent. De plus, la dose de rifabutine doit être adaptée en fonction de l'interaction attendue avec l'antiprotéase et ajustée selon les dosages sériques. Par exemple, 150 mg/j de rifabutine suffisent lorsqu'il y a prise concomitante d'indinavir.

3.4. Chirurgie

La chirurgie souvent proposée auparavant pour un meilleur contrôle de la maladie et une meilleure prévention des rechutes n'est plus un recours systématique pour les formes habituelles. En revanche, l'excision-biopsie d'adénopathies peut être nécessaire au diagnostic, ou dans un but curatif ou de décompression.

4. Traitement des infections à mycobactéries à croissance rapide

Des infections cutanées communautaires ou nosocomiales dues à des mycobactéries à croissance rapide peuvent survenir de façon sporadique. Trois mycobactéries sont principalement en cause (> 90 % des cas) : *M. fortuitum, M. abscessus* et *M. chelonae*. D'autres, telles que *M. smegmatis, M. peregrinum, M. mucogenicum,* sont rares en pathologie humaine.

4.1. Options antibiotiques

Ces espèces sont naturellement résistantes aux antituberculeux habituels. Seul l'éthambutol présente un intérêt vis-à-vis de *M. smegmatis*. En revanche, elles sont sensibles à des antibiotiques classiques, surtout *M. fortuitum*. En effet, les souches de *M. fortuitum* sont parfaitement sensibles in vitro à l'amikacine, aux fluoroquinolones (ciprofloxacine, ofloxacine), aux sulfamides, à l'imipénème (100 %) et, dans une moindre mesure, à la céfoxitine et à la clarithromycine

(80 %), à la doxycycline (50 %). Les souches de *M. abscessus* sont sensibles à la clarithromycine (100 %), la clofazimine et l'amikacine (90 %), la céfoxitine (70 %) et l'imipénème (50 %). Les souches de *M. chelonae* sont sensibles à la clarithromycine et la tobramycine (100 %), l'amikacine (80 %), l'imipénème (60 %), la clofazimine et la doxycycline (25 %), la ciprofloxacine (20 %).

4.2. Orientations thérapeutiques

Les infections cutanées provoquées par ces mycobactéries surviennent généralement sur lésions post-traumatiques ou après chirurgie. Certaines infections limitées peuvent guérir spontanément ou après exérèse chirurgicale, parfois après une durée d'évolution prolongée sur plusieurs mois. Cependant, les traitements médicamenteux récents permettent d'obtenir de meilleurs résultats, au mieux combinés à la chirurgie qui permet le drainage d'abcès ou l'ablation de matériel infecté. *M. abscessus* et, dans une moindre mesure, *M. fortuitum*, sont des pathogènes responsables aussi d'infections pulmonaires donnant des lésions d'évolution le plus souvent chronique évoluant vers des bronchectasies. En l'absence d'essai clinique comparatif, les sensibilités in vitro sont la base des choix thérapeutiques. Par conséquent, elles doivent être systématiquement déterminées pour toute souche isolée responsable de manifestations cliniques. Habituellement, toutes ces infections répondent favorablement à un traitement de six à douze mois associant deux médicaments auxquels les souches sont sensibles. Un schéma thérapeutique proposé pour *M. fortuitum* peut constituer une base pour le traitement des mycobactéries similaires. Il débute par une association en perfusion intraveineuse d'amikacine (10–15 $mg{\cdot}kg^{-1}{\cdot}j^{-1}$), de céfoxitine (12 g/j) et de probénécide pour une durée de deux à six semaines. Pour cette phase initiale, l'imipénème est une alternative possible à la céfoxitine, en particulier lorsqu'il existe une résistance à ce produit (*M. chelonae, M. smegmatis*). Pour *M. chelonae*, la tobramycine est plus efficace in vitro que l'amikacine. Le relais se fait par un traitement d'entretien oral de deux à six mois avec le cotrimoxazole ou la doxycycline, voire éventuellement en multithérapie. Le passage à la forme orale peut se faire dès l'amélioration confirmée et selon les résultats des tests in vitro.
La clarithromycine (500 mg × 2/j) donnée pendant six mois per os en monothérapie permet une guérison dans la majorité des cas d'infections à *M. chelonae* ou *M. abscessus*. D'autres molécules parmi lesquelles l'azithromycine et à la rifabutine ont montré un intérêt, mais des résistances existent.

5. Traitement des infections pulmonaires liées à d'autres mycobactéries atypiques

La plupart des mycobactéries atypiques peuvent être à l'origine d'infections pulmonaires, mais seules quatre espèces supplémentaires à croissance lente ont donné lieu à des recommandations thérapeutiques : *M. xenopi, M. malmoense, M. simiae, M. szulgai*. En l'absence d'essai clinique et compte tenu

du peu de cas rapportés, ces recommandations doivent être adaptées au cas par cas. De plus, une durée de traitement de 18 à 24 mois est préconisée lorsque les réponses cliniques et bactériologiques sont favorables.
M. xenopi est relativement fréquente sous la forme d'infections pulmonaires, plus rarement responsable d'infections disséminées. In vitro, l'efficacité des antituberculeux sur *M. xenopi* est variable. Elle est sensible à la clarithromycine et à la rifabutine. Il n'existe pas de schéma thérapeutique optimal et déterminant. Les résultats des différents essais de combinaisons thérapeutiques, y compris le recours à la chirurgie, sont variables. Par conséquent, le choix reste principalement sur une option initiale similaire au traitement des infections à *M.* complexe *avium*, associant un macrolide tel que la clarithromycine, la rifampicine ou la rifabutine, et l'éthambutol, avec ou sans adjonction d'une fluroquinolone (ciprofloxacine, ofloxacine) ou d'un aminoside.
La plupart des souches de *M. malmoense* sont sensibles in vitro à l'éthambutol, la rifampicine et la streptomycine. La quadrithérapie recommandée pour le traitement des infections à MAC a donné de bons résultats sur *M. malmoense*. L'amélioration possible par l'utilisation des nouveaux macrolides et de la rifabutine n'a pas été évaluée.
M. simiae, dont le rôle pathogène est difficile à établir, peut être confondue avec *M. tuberculosis*. Mais au sein de cette espèce, la majorité des souches résistent à tous les antituberculeux de première ligne. Le principe du traitement repose sur l'utilisation en première intention du schéma recommandé pour les infections disséminées à MAC (clarithromycine, éthambutol, rifabutine et amikacine), adapté secondairement selon les données des tests de sensibilité in vitro.
M. szulgai est à considérer systématiquement comme pathogène lorsqu'elle est mise en évidence chez l'humain. Elle est responsable d'infections variées, localisées ou disséminées. L'espèce est généralement sensible aux antituberculeux de première ligne (rifampicine, isoniazide, éthambutol). Cependant, à visée thérapeutique, d'après les données in vitro, il semble plus efficace de les utiliser en association et à des concentrations élevées.

6. Traitement des infections à *Mycobacterium marinum*

M. marinum est à l'origine de granulomes cutanés dits d'aquarium ou de piscine, environnements habituels de contamination par inoculation. Les régimes antibiotiques efficaces sont au choix la clarithromycine (500 mg × 2/j), la minocycline ou la doxycycline (200 mg/j), le cotrimoxazole (800 mg × 2/j), ou la rifampicine (600 mg/j) associée à l'éthambutol (15 $mg \cdot kg^{-1} \cdot j^{-1}$) pendant une durée de trois mois. *M. marinum* est naturellement résistant à l'isoniazide et au pyrazinamide. Du fait de la localisation fréquente aux espaces clos de la main, l'excision chirurgicale est requise, en cas de lésion exubérante ou d'évolution insuffisamment satisfaisante sous antibiotiques. Cette évolution ne peut être évaluée qu'après quatre à six semaines de traitement. Le recours immédiat ou secondaire à la chirurgie nécessite l'adjonction d'un traitement antibiotique pour encadrer le geste opératoire, sans que la durée ultérieure soit formellement définie.

7. Surveillance sous traitement

La surveillance de l'évolution sous traitement inclut tout particulièrement une vigilance accrue vis-à-vis des effets indésirables liés aux médicaments. En effet, l'âge souvent avancé auquel surviennent ces infections, un état de santé fragilisé, voire immunodéprimé, les médicaments utilisés et leurs combinaisons sont des risques supplémentaires à superviser et à maîtriser. L'essentiel des modalités de cette surveillance est donné dans le Tableau 4.3 selon le type de médicament. De plus, les posologies doivent être régulièrement révisées et adaptées aux fonctions rénale et hépatique, et selon l'évolution du poids. Les dosages pharmacologiques des antibiotiques (taux sériques) sont parfois indispensables pour vérifier l'absence de toxicité (aminosides) et gérer les interactions. Ils peuvent aussi être utiles pour contrôler l'adéquation entre efficacité et résultats des tests in vitro.

8. Conclusion

Les infections à mycobactéries atypiques sont des infections d'importance croissante tant par leur prévalence que par la variété des espèces mises en évidence en pathologie humaine. Ces infections sont souvent pulmonaires, mais d'autres localisations très diverses, voire disséminées, existent. Leur mode de présentation clinique est très variable, allant d'une forme d'infection occulte de découverte systématique à une forme symptomatique, survenant en particulier sur un terrain prédisposé fragilisé. La diversité des pathologies liées à ces mycobactéries et la co-morbidité des patients chez lesquels elles surviennent rendent difficile la prise en charge diagnostique et thérapeutique. Le traitement n'est pas univoque et n'est pas formellement déterminé pour toutes les espèces. Des recommandations générales existent pour le traitement initial, mais les choix thérapeutiques doivent être orientés essentiellement par les tests de sensibilité in vitro dès qu'ils sont disponibles. L'antibiogramme étant souvent peu fiable (sauf pour *M. kansasii*), il faut davantage se fier aux CMI pour le choix des antibiotiques. La durée de traitement préconisée est souvent prolongée, pouvant s'étendre sur plusieurs mois, voire années. Il est recommandé de se fier à l'évolution clinique et bactériologique mais ces critères ne sont pas toujours suffisants. Une prophylaxie secondaire est parfois nécessaire. Les circonstances particulières de survenue de ces infections et les modalités thérapeutiques requièrent au mieux un avis et un suivi en milieu spécialisé, à la fois pour les choix stratégiques initiaux et la conduite du traitement.

Pour en savoir plus

Aberg JA, Yajko DM, Jacobson MA. Eradication of AIDS-related disseminated *Mycobacterium avium* complex infection after 12 months of antimycobacterial therapy combined with highly active antiretroviral therapy. J Infect Dis 1998 ; 178 : 1446-9.

American Thoracic Society. Diagnosis and treatment of disease caused by non-tuberculous mycobacteria. Am J Respir Crit Care Med 1997 ; 156 : S1-S25.

Cohn DL, et al. Prospective randomized trial of four three-drug regimens. Clin Infect Dis 1999 ; 29 : 125-33.

Dautzenberg B, et al. Clarithromycin and other antimicrobial agents in the treatment of disseminated *Mycobacterium avium* infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome. Arch Intern Med 1993 ; 153 : 368-72.

Falkinham JO. Epidemiology of infection by non-tuberculous mycobacteria. Clin Microbiol Rev 1996 ; 9 : 177-215.

Gordin FM, et al. A randomized, placebo-controlled study of rifabutin added to a regimen of clarithromycin and ethambutol for treatment of disseminated infection with *Mycobacterium avium* complex. Clin Infect Dis 1999 ; 28 : 1080-5.

May T, et al. Comparison of combination therapy regimens for treatment of human immunodeficiency virus-infected patients with disseminated bacteremia due to *Mycobacterium avium*. Clin Infect Dis 1997 ; 25 : 621-9.

Pomerantz M, Madsen L, Goble M, Iseman M. Surgical management of resistant mycobacterial tuberculosis and other mycobacterial pulmonary infections. Ann Thorac Surg 1991 ; 52 : 1108-12.

Ward TT, Rimland D, Kauffman C, Huycke M, Evans TG, Heifets L. Randomized, open-label trial of azithromycin plus ethambutol vs clarithromycin plus ethambutol as therapy for *Mycobacterium avium* complex bacteremia in patients with human immunodeficiency virus infection. Clin Infect Dis 1998 ; 27 : 1278-85.

Watt B. In-vitro sensitivities and treatment of less common mycobacteria. Journal Antimicrob Chemother 1997 ; 39 : 567-74.

Wolinsky E. State of the Art : Non-tuberculous mycobacteria and associated diseases. Am Rev Respir Dis 1979 ; 119 : 107-59.

Mycobacterium tuberculosis et mycobactéries atypiques

Chapitre 5

Tuberculose de l'enfant

Joël Gaudelus

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) estimait à 90 millions le nombre de nouveaux cas de tuberculose et à 30 millions le nombre de morts dans le monde au cours de la décennie 1990. Environ 15 millions de ces nouveaux cas et 5 millions des morts sont survenus chez des enfants de moins de cinq ans. Endémique et très fréquente dans les pays en voie de développement, la tuberculose a diminué régulièrement pendant des décennies dans la plupart des pays industrialisés. Un ralentissement puis une inversion de la pente de régression des cas déclarés a été observée au début des années 1990 dans nombre de pays industrialisés dont la France. Depuis 1993, on observe à nouveau une diminution de l'incidence dans notre pays. L'enfant se contamine dans plus de 98 % des cas à partir d'un adulte qui diffuse du BK. Toute augmentation de la tuberculose chez l'adulte a donc pour conséquence une augmentation de la tuberculose chez l'enfant. La population pédiatrique (moins de 15 ans) représente 5,5 % des cas de tuberculose déclarés en France dont 50 % chez des sujets de moins de cinq ans.
La tuberculose de l'enfant possède des particularités par rapport à celle de l'adulte :
– la maladie se développe dans les suites immédiates d'une primo-infection. Le nombre de mycobactéries y est en règle relativement faible, ce qui a deux conséquences : d'une part, la preuve bactériologique est rare, moins de 50 % avec les techniques bactériologiques classiques ; d'autre part, l'enfant est peu ou pas contagieux et le risque de voir apparaître une bactérie résistante est moins important ;
– le risque de passage de la tuberculose infection à la tuberculose maladie est plus important chez l'enfant et varie en fonction de l'âge. Il est estimé à 43 % avant l'âge d'un an, 24 % entre un et cinq ans, 15 % entre 11 et 15 ans alors qu'il est chez l'adulte de 5 à 10 %. Les formes de l'adolescent peuvent être rapidement évolutives ;
– le risque de développer une forme grave (forme disséminée, méningite) est plus important chez l'enfant, tout particulièrement chez le nourrisson.

1. Physiopathologie – Définitions

L'agent causal de la tuberculose est *Mycobacterium tuberculosis* (bacille de Koch ou BK). Beaucoup plus rarement, il peut s'agit de *Mycobacterium bovis* et, exceptionnellement, du moins dans les pays industrialisés, de *Mycobacterium africanum*. Le BK est transmis par l'intermédiaire de particules aériennes. Après inhalation, ces particules se déposent au niveau des alvéoles où les bacilles sont phagocytés par des macrophages. À ce niveau, les bacilles peuvent être tués, mais ils peuvent aussi rester vivants et se multiplier au sein des macrophages jusqu'à aboutir à leur destruction. Les bacilles libérés sont alors de nouveau phagocytés par d'autres macrophages et d'autres cellules inflammatoires. Un foyer infectieux local se constitue progressivement : le tubercule contenant des macrophages vivants, des macrophages « dégénérés » (cellules épithélioïdes), des macrophages fusionnés (cellules géantes), des bacilles et des lymphocytes. Ce tubercule peut devenir un granulome avec nécrose centrale et fibrose. Les bacilles isolés ou ingérés par des macrophages sont transportés par les canaux lymphatiques vers les ganglions

lymphatiques régionaux. Le site alvéolaire initial et les ganglions infectés constituent le complexe primaire. Ils peuvent diffuser par voie lymphatique et/ou sanguine vers d'autres sites. Leur multiplication au sein de ces sites est variable en fonction des organes.
Dans la plupart des cas, le développement d'une immunité cellulaire spécifique limite la multiplication bacillaire, le sujet reste asymptomatique : c'est la tuberculose infection ou primo-infection latente. Dans les autres cas, la multiplication bacillaire est mal contrôlée et une tuberculose active apparaît : c'est la tuberculose maladie. Elle se développe en règle dans l'année qui suit l'infection, mais elle peut se développer plusieurs années après.
La tuberculose infection témoigne de la rencontre avec le BK. Elle se traduit par un simple virage des réactions tuberculiniques avec un examen clinique normal, une radiographie de thorax normale et une bactériologie négative.
La tuberculose maladie s'accompagne de signe(s) clinique(s) et/ou radiologique(s) et/ou d'une bactériologie positive.
Le risque de passage de la tuberculose infection à la tuberculose maladie est d'autant plus important que l'enfant est plus jeune.

2. Circonstances du diagnostic

2.1. Le diagnostic de tuberculose de l'enfant est difficile

Par définition, la tuberculose infection (ou primo-infection latente) ne se traduit que par la positivation des réactions tuberculiniques avec un examen clinique normal, une radiographie de thorax normale et une bactériologie négative.
La tuberculose maladie s'accompagne de signe(s) clinique(s) et/ou radiologique(s) et/ou d'une bactériologie positive. Selon les séries, 20 à 60 % des tuberculoses maladies sont asymptomatiques chez l'enfant. Lorsque la tuberculose provoque des symptômes, ceux-ci n'ont aucune spécificité. L'essentiel est de penser à la tuberculose devant tout contexte à risque et devant toute situation clinique, en particulier respiratoire qui, traitée de façon correcte, n'évolue pas comme d'habitude.

2.2. La tuberculose de l'enfant doit être évoquée dans tout contexte à risque

Doivent être considérés comme un contexte à risque :
– les familles de migrants des pays à haute prévalence : dans notre pays, l'incidence chez les enfants de nationalité étrangère est huit fois supérieure à celle observée chez les enfants de nationalité française (12,8 versus 1,6 pour 100 000). Dans l'enquête Île-de-France de 1997, le pays de naissance était la France pour 163 enfants (76 %) et l'étranger pour 51 (24 %), mais 80 % des enfants ayant une tuberculose avaient des parents nés à l'étranger. Dans ces familles, il est absolument nécessaire de répertorier qui vit à domicile et qui a séjourné à domicile dans les mois précédents (oncles et tantes, cousins, grands-parents, parfois uniquement pendant des vacances). Chaque fois qu'il existe une suspicion de tuberculose, l'entourage proche de l'enfant doit avoir

un examen clinique, une radiographie pulmonaire et une intradermoréaction à la tuberculine. Les résultats des investigations doivent être consignés sur le dossier de l'enfant ;
– les milieux sociaux défavorisés ayant des difficultés d'accès aux soins : la tuberculose est aussi une maladie sociale ;
– les familles dans lesquelles il existe une infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) qui sont davantage exposées à faire une tuberculose maladie et donc à transmettre le BK ;
– il existe par ailleurs des facteurs favorisants : conditions d'hygiène précaires, promiscuité, malnutrition, existence d'une pathologie médicale de type immunodépression congénitale ou acquise, pathologie maligne, absence de vaccination par le BCG.
La tuberculose doit être systématiquement évoquée devant tout contage surtout s'il est massif et répété.
La recherche d'un contaminateur dans l'entourage proche et la connaissance chez lui des signes cliniques évocateurs est essentielle et constitue un élément très important pour le diagnostic de tuberculose de l'enfant. Par ailleurs, l'identification du ou des contaminateur(s) impose l'évaluation et la prise en charge de tous les enfants de son entourage.

2.3. La symptomatologie quand elle existe n'est pas spécifique

Dans l'enquête hospitalière sur la tuberculose de l'enfant en Île-de-France qui a inclus 240 cas dont 73 (30 %) avaient une tuberculose maladie et 167 (70 %) une tuberculose infection, le motif de consultation a été recueilli pour 236 enfants (98 %). Le diagnostic a été fait dans le cadre d'un examen systématique, en dehors de tout cas de tuberculose diagnostiqué dans l'entourage pour 106 enfants (45 %), dans le cadre d'un dépistage dans l'entourage d'un cas de tuberculose pour 92 enfants (39 %) et, pour 38 (16 %), des signes cliniques ont amené l'enfant à consulter.
L'important est d'évoquer la possibilité du diagnostic et d'évaluer précisément l'histoire et le contexte. Il peut s'agir :
– de signes généraux : fièvre qui peut revêtir tous les types mais qui doit faire discuter systématiquement le diagnostic dès qu'elle se prolonge ; asthénie ; anorexie ; amaigrissement ou mauvaise croissance pondérale ; sueurs nocturnes ;
– de signes respiratoires au premier rang desquels la toux, parfois accompagnée d'anomalies à l'auscultation, d'une tachypnée voire d'une dyspnée ;
– de troubles digestifs à type de vomissements ou de diarrhée.
Les aspects classiquement décrits : typhobacillose (fièvre élevée prolongée), érythème noueux, kératoconjonctivite phlycténulaire doivent faire évoquer le diagnostic mais ces manifestations sont devenues rares, voire exceptionnelles.
À titre d'exemple, les symptômes et signes cliniques des 73 enfants atteints de tuberculose maladie de l'enquête Île-de-France 1997 sont rapportés dans le Tableau 5.1.

3. Formes cliniques de la tuberculose de l'enfant

La tuberculose de l'enfant doit être évoquée devant différents tableaux. Ils dépendent de la localisation et de l'âge.

Tableau 5.1
Symptômes et signes cliniques des 73 enfants atteints de tuberculose-maladie de l'enquête Île-de-France 1997

Symptômes	*n* (%)	Signes cliniques	*n* (%)
Fièvre Toux	18 (25) 27 (37)	Adénopathies Signes auscultatoires	12 (16) 12 (18)
Dyspnée	5 (7)	Hépatomégalie	2 (3)
Anorexie	11 (15)	Splénomégalie	0 (0)
Amaigrissement	7 (9)	Signes neurologiques	4 (5)
Asthénie	14 (19)	Autres signes	9 (12)
Au moins un symptôme	41 (56)	Au moins un signe	24 (33)

3.1. En fonction de la localisation

Compte tenu de la physiopathologie, tous les tissus et/ou organes peuvent être atteints.

3.1.1. Tuberculose médiastinopulmonaire

C'est de loin la localisation la plus fréquente et, isolée ou associée, elle représente plus de 80 % des cas. Toute suspicion de tuberculose doit faire demander des radiographies de thorax de face en inspiration et en expiration et un profil. Cet examen est essentiel permettant de distinguer la tuberculose infection (radiographie normale) et la tuberculose maladie (radiographie anormale). Les anomalies devant faire évoquer le diagnostic de tuberculose sont diverses. Il peut s'agir :
– d'adénopathie(s) isolée(s) ou multiple(s). Leur siège est variable : latérotrachéal droit, sus-hilaire droit et gauche, interbronchique, intertrachéobronchique. Elles siègent sur le profil dans le médiastin moyen. Elles sont souvent bilatérales ;
– d'une opacité parenchymateuse. Le plus souvent de petite taille, elle constitue le « nodule primaire ». L'ensemble adénopathie-nodule primaire constitue le complexe primaire. Il peut s'agir plus rarement d'un foyer alvéolaire systématisé réalisant la « pneumonie tuberculeuse » ;
– de troubles de ventilation qui sont de deux types :
• soit opacité segmentaire par obstruction complète de la bronche, atteignant un lobe ou un segment de lobe qui peut se rétracter, réalisant une atélectasie ;
• soit hyperclarté avec distension.
L'association d'une opacité segmentaire et d'une hyperclarté adjacente est très évocatrice de granulome endobronchique ;
– d'une miliaire : dissémination bilatérale et homogène d'opacités « en grains » de taille inférieure à 3 mm parfois difficile à mettre en évidence au début ;
– d'un épanchement pleural d'abondance variable ou d'un abcès froid pleural : opacité en verre de montre raccordée à la paroi par un angle obtus ;

– d'un gros cœur dont le volume sera apprécié par la mesure du rapport cardiothoracique et qui doit faire rechercher une péricardite.
La forme dite adulte de la tuberculose pulmonaire avec cavernes apicales à bords épais, liée à une réactivation de la tuberculose, est rare ou même exceptionnelle chez l'enfant, mais elle peut se voir chez l'adolescent.
Dans un contexte de suspicion de tuberculose, si la radiographie de thorax est anormale, une tomodensitométrie est justifiée. Elle permet de mieux évaluer le nombre des adénopathies, leur localisation, leur caractère compressif. Après injection, elles sont hypodenses en leur centre et sont cernées par une prise de contraste en périphérie. Dans la mesure où la tomodensitométrie peut déceler de petites adénopathies non vues sur le cliché standard, elle est recommandée par certains systématiquement avant l'âge de cinq ans.
La fibroscopie bronchique est justifiée devant toute anomalie de la radiographie de thorax si une tuberculose est suspectée. Elle permet de retrouver des anomalies endobronchiques dans 60 % des cas où le cliché de thorax ne révèle que des lésions parenchymateuses. Elle permet souvent un diagnostic de certitude lorsqu'elle visualise un granulome endobronchique ou plus rarement du caséum endobronchique. Elle permet enfin d'évaluer le degré d'obstruction endobronchique et contribue à poser les indications d'une corticothérapie associée aux antituberculeux quand l'obstruction dépasse 50 % de la lumière bronchique, ou d'une indication opératoire en cas de volumineuse adénopathie latérotrachéale en voie de fistulisation.

3.1.2. Tuberculose pleurale

En dehors d'une réaction pleurale localisée accompagnant le complexe primaire, la pleurésie sérofibrineuse est rare avant deux ans. Elle peut se voir chez le grand enfant. Le liquide pleural est inflammatoire avec une cellularité à prédominance lymphocytaire. L'abcès froid est une forme rare de tuberculose pleurale. L'échocardiographie doit être systématique en cas d'atteinte pleurale.

3.1.3. Miliaire tuberculeuse

Elle correspond à une diffusion hématogène de la maladie avec formation de multiples foyers. Les poumons sont pratiquement toujours atteints. Elle survient trois à six mois après la primo-infection. Elle s'observe avant tout chez le nourrisson (plus de 50 % avant un an), mais peut se voir à tout âge. Une atteinte méningée est associée dans 20 % des cas. Fond d'œil et ponction lombaire doivent être systématiques. Les réactions tuberculiniques sont le plus souvent négatives.

3.1.4. Méningite tuberculeuse

Elle est devenue rare dans notre pays : il existe moins de dix méningites tuberculeuses déclarées par an chez les moins de 15 ans dont trois à cinq chez les moins de cinq ans. C'est une complication précoce de l'invasion tuberculeuse. Le nourrisson y est particulièrement exposé. Le début est souvent insidieux : fièvre, anorexie, stagnation pondérale, vomissements, parfois céphalées. Il est essentiel de rechercher à ce stade des troubles du comportement : irritabilité,

apathie qui imposent la ponction lombaire. Les signes neurologiques n'apparaissent le plus souvent que secondairement : convulsions, paralysie oculomotrice, troubles de la conscience pouvant aller jusqu'au coma. Le diagnostic repose avant tout sur l'examen du liquide céphalorachidien qui montre une pléiocytose à prédominance lymphocytaire avec hyperprotéinorachie et hypoglycorachie. Les réactions cutanées à la tuberculine sont négatives une fois sur deux. La radiographie thoracique peut être normale. Le fond d'œil peut montrer des tubercules de Bouchut. Un scanner cérébral doit être systématique en cas de méningite tuberculeuse. Le pronostic est d'autant plus sévère que le diagnostic est tardif.

3.1.5. Tuberculose ganglionnaire. Adénopathies périphériques

Elles siègent avant tout au niveau du cou. En dehors des cas très exceptionnels actuellement où l'adénopathie est satellite d'un chancre d'inoculation buccal (*Mycobacterium bovis* amené par du lait cru contaminé), elles sont secondaires à l'infection de ganglions lymphatiques lors de la bactériémie survenant à la période initiale de l'infection. Les bacilles restent le plus souvent quiescents mais peuvent être réactivés par différents mécanismes, expliquant la possibilité de survenue tardive. Elles posent le problème des adénopathies cervicales de l'enfant et doivent être différenciées des adénites cervicales à mycobactéries atypiques. D'autres localisations peuvent se voir : axillaire, inguinale, etc.

3.1.6. Tuberculose abdominale

Elle est rare, voire exceptionnelle dans notre pays. Le délai entre les premiers signes et le diagnostic est souvent long car la tuberculose est rarement évoquée en première intention. Elle comporte des aspects multiples en fonction de l'atteinte des ganglions mésentériques, du péritoine ou du tube digestif. L'échographie abdominale est un examen fondamental. L'atteinte ganglionnaire peut se présenter comme des adénopathies ou encore comme une masse abdominale posant le problème d'un lymphome, ce d'autant qu'il peut s'y associer une altération de l'état général avec amaigrissement. L'atteinte péritonéale est de diagnostic clinique difficile : douleurs abdominales sans spécificité, troubles du transit, rarement tableau d'occlusion. L'ascite est inconstante, c'est un exsudat lymphocytaire riche en protéines. La tuberculose intestinale prédomine dans la région iléocæcale et peut poser le problème d'une maladie de Crohn.

3.1.7. Tuberculose osseuse

Elle est responsable de 10 % des formes extrapulmonaires de tuberculose aux États-Unis. Son diagnostic est souvent tardif. La maladie peut se développer dans les suites initiales de l'infection ou plusieurs années plus tard, à la suite d'une réactivation locale. Le rachis est le plus fréquemment atteint, surtout dans les régions thoracique et lombaire. L'infection débute dans la partie antérieure du corps vertébral puis s'étend par contiguïté au disque intervertébral et vers d'autres vertèbres réalisant une spondylodiscite. Il peut exister un abcès paravertébral. Tous les os peuvent être touchés : fémur, tibia, moins fréquemment les os des mains et des pieds. Des aspects radiologiques de destruction,

sclérose, ostéopénie, réaction périostée sont habituels. La radiographie thoracique est normale une fois sur deux. Le diagnostic est fait par biopsie osseuse avec isolement du BK.

3.1.8. Tuberculose urogénitale

Elle est tout à fait exceptionnelle chez l'enfant. Elle ne se développe en règle que plusieurs années après l'infection. Isolée, elle se traduit le plus souvent par une pyurie amicrobienne.

3.1.9. Autres localisations

D'autres localisations sont possibles : péricardiques, génitales, organes hématopoïétiques, cutanées, ORL, etc. Elles sont exceptionnelles en France.

3.2. En fonction de l'âge

3.2.1. Tuberculose congénitale

Une bacillémie tuberculeuse pendant la grossesse peut être responsable d'une atteinte placentaire et/ou du tractus génital maternel. Le fœtus peut être contaminé soit par voie hématogène à partir du placenta, déterminant une atteinte hépatique, pulmonaire et éventuellement d'autres sites ; soit par inhalation et/ou ingestion de liquide amniotique contaminé déterminant une atteinte pulmonaire ou digestive. La contamination fœtale est rare. Le risque est augmenté si la mère est séropositive pour le VIH. La mère peut être asymptomatique, la maladie de l'enfant venant alors révéler la tuberculose maternelle. Chez l'enfant, les signes cliniques sont non spécifiques et s'expriment dans le premier mois de vie : détresse respiratoire (76 %), hépatomégalie avec ou sans splénomégalie (65 %) et fièvre (57 %) sont les signes les plus fréquents. La radiographie de thorax ne montre le plus souvent que des infiltrats non spécifiques. L'IDR à la tuberculine est souvent négative. Le pronostic est grave et la mortalité élevée : de l'ordre de 50 % globalement et de 20 % chez les enfants traités.

3.2.2. Tuberculose du nouveau-né

L'enfant peut avoir été contaminé après la naissance à partir d'une mère bacillifère. La distinction avec une tuberculose congénitale est difficile. La prise en charge est la même.

3.2.3. Tuberculose du nourrisson

Le nourrisson est plus souvent symptomatique que l'enfant plus grand. Chez l'enfant de moins d'un an dans la série de Vallejo, la fréquence des principaux symptômes est la suivante : toux (79 %), fièvre (64 %), anorexie (43 %), râles localisés à l'auscultation ou wheezing (38 %), diarrhée et/ou vomissements (17 %), perte de poids (15 %), convulsions (11 %).
Le risque de développer une forme grave (forme disséminée, méningite) est plus important. Les nourrissons présentant une forme disséminée ont souvent une hépatosplénomégalie.

Dans les formes à localisation pulmonaire, les complications trachéobronchiques sont plus fréquentes. La fistulisation ganglionnaire doit être redoutée en cas de poussée fébrile, toux, diminution brutale du volume ganglionnaire. Elle peut réaliser un tableau asphyxique par inondation des voies aériennes en cas de fistulisation d'une adénopathie latérotrachéale. Même sous traitement, les adénopathies peuvent augmenter de volume, provoquer des troubles de ventilation ou se fistuliser.

3.2.4. Tuberculose de l'adolescent

À la puberté, la tuberculose peut prendre une allure évolutive grave : tuberculose pulmonaire quelquefois très extensive, forme ulcérocaséeuse avec constitution d'une caverne, rendant le sujet très contagieux.

3.3. Tuberculose et VIH

Une sérologie VIH est conseillée actuellement lors de toute tuberculose de l'enfant. Parmi d'autres étiologies, la tuberculose doit être suspectée lors des infections respiratoires traînantes de l'enfant séropositif pour le VIH. En 2000, le statut sérologique VIH était connu pour 39 % des cas déclarés en France tous âges confondus. La proportion de sujets infectés par le VIH parmi l'ensemble des cas de tuberculose était de 4,9 % (6,7 % en Île-de-France). Elle était de 4,7 % en 1997.
Chez l'enfant, en 2000, la sérologie est connue pour 45 (14,7 %) des 305 cas déclarés de 0 à 14 ans. Elle est positive dans un cas, soit 0,3 %.
La tuberculose maladie est plus fréquente que la tuberculose infection chez les enfants ayant une sérologie VIH positive. Les symptômes cliniques ont le plus souvent une allure banale : toux, signes respiratoires associés. La fièvre est fréquente. Ces signes s'inscrivent dans un tableau plus général : hépatosplénomégalie, adénopathies périphériques, candidose orale et anorexie. En règle générale, le déficit immunitaire est profond avec un taux de CD4 moyen à $120/mm^3$. Les sujets séropositifs pour le VIH font plus de formes disséminées ou extrapulmonaires.

4. Diagnostic

Il repose sur trois ordres de données :
– des données anamnestiques : notion de contage, recherche d'un contaminateur avant tout dans l'entourage immédiat mais aussi parfois à l'école ou ailleurs ;
– des données cliniques : non spécifiques mais plus ou moins évocatrices ;
– des données paracliniques qui sont la clé du diagnostic.

4.1. Examens à faire en cas de suspicion de tuberculose

4.1.1. Réactions cutanées à la tuberculine

Seule l'intradermoréaction à la tuberculine est quantitative et comparable d'un examen à l'autre. La tuberculine disponible en France est le Tubertest® qui a remplacé la tuberculine Mérieux®. Tubertest® (laboratoires Aventis Pasteur

MSD) est une tuberculine DPP (dérivé protéinique purifié) obtenue à partir d'une souche humaine de *M. tuberculosis*. La comparaison avec la tuberculine RT 23 (tuberculine de référence OMS) a montré une bonne concordance des résultats des tests avec une équivalence en sensibilité et spécificité supérieure à 90 %. Après désinfection à l'éther, l'injection de 0,1 ml = 10 unités de tuberculine est faite à la face antérieure de l'avant-bras, en situation intradermique stricte, déterminant la formation d'une papule avec phénomène de la peau d'orange. La lecture se fait au bout de 72 heures en mesurant le diamètre de l'induration. La valeur retenue est celle du plus grand diamètre.
L'interprétation du résultat de l'IDR chez un sujet donné ne peut se faire qu'en tenant compte du contexte (fréquence de la tuberculose dans la population, incidence des mycobactéries atypiques) et du statut vaccinal (Fig. 5.1).

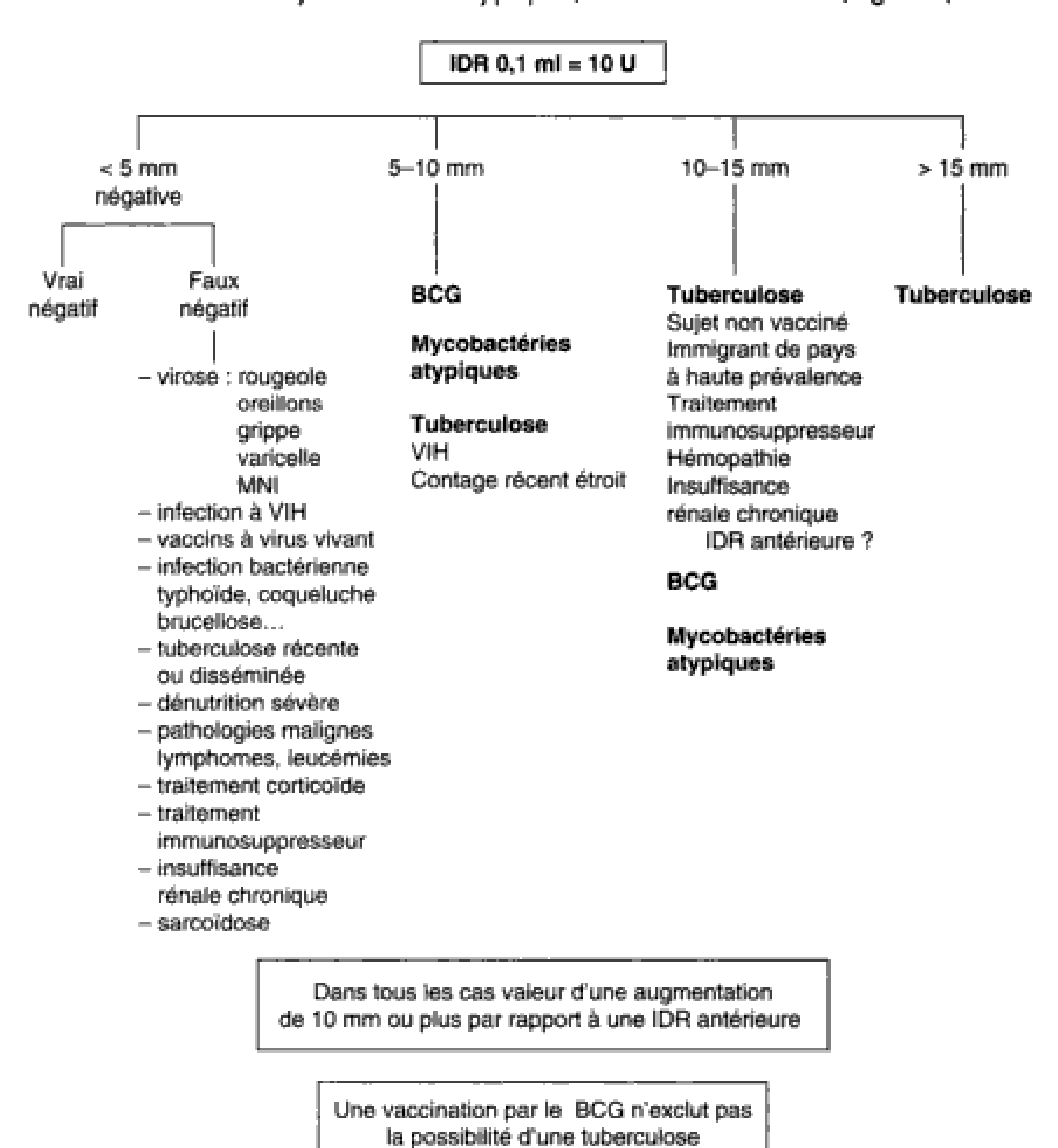


Figure 5.1. Interprétation de l'IDR en fonction du contexte et du statut vaccinal.

En pratique courante, chez les sujets dont l'immunité est normale :
– une IDR de moins de 5 mm doit être considérée comme négative ; une IDR négative n'exclut jamais une tuberculose ;
– une IDR entre 5 et 10 mm est en rapport soit avec une immunisation par le BCG, soit avec une infection inapparente due à des mycobactéries atypiques ;
– une IDR supérieure ou égale à 10 mm exprime soit une tuberculose, soit plus rarement une immunisation par le BCG ;
– une IDR supérieure à 15 mm et/ou d'aspect phlycténulaire doit être considérée comme témoignant d'une tuberculose.
En l'absence de BCG antérieur, une induration supérieure à 10 mm traduit une infection tuberculeuse.
Chez les sujets vaccinés, la tuberculose est plus rare mais possible. Elle doit toujours être envisagée devant une augmentation de 10 mm ou plus entre deux tests en l'absence de revaccination.

4.1.2. Imagerie thoracique

L'imagerie thoracique est indispensable. Ses résultats ont été détaillés dans la description des formes médiastinopulmonaires.

4.1.3. Recherche de *Mycobacterium tuberculosis*

La preuve bactériologique de la tuberculose chez l'enfant est rare. L'examen direct du liquide de tubage gastrique ne donne une réponse positive que dans moins de 20 % des cas. Les cultures de ces prélèvements n'apportent la confirmation de l'infection que dans moins de 50 % des cas. Sur les 73 cas de tuberculose maladie de l'enfant vus à l'hôpital rapportés en Île-de-France en 1997, dix (14 %) avaient un examen direct positif et 25 (34 %) une culture positive.

4.1.3.1. Recueil des échantillons

Des tubages gastriques doivent être réalisés au moins trois jours de suite, si possible le matin à jeun, avant que l'enfant ne se lève afin de recueillir les sécrétions bronchiques dégluties pendant la nuit avant que la vidange gastrique ne se produise. Lorsqu'une endoscopie bronchique est réalisée, un tubage gastrique doit être effectué le lendemain matin.
Le lavage broncho-alvéolaire réalisé au cours de la fibroscopie bronchique n'a pas une sensibilité supérieure à celle des tubages gastriques.
Les autres prélèvements sont guidés par la clinique : urines, biopsie ganglionnaire, liquide pleural... La ponction lombaire est systématique avant 18 mois.

4.1.3.2. Analyse des prélèvements

Ces prélèvements doivent toujours comporter un examen microscopique (examen direct) et une culture.

4.1.3.2.1. Examen microscopique

L'examen microscopique des frottis de produit pathologique après coloration de Ziehl-Neelsen permet de détecter les bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR), propriété caractéristique des mycobactéries. La spécificité de cette méthode pour la détection d'une mycobactérie est proche de 100 %, mais sa sensibilité est faible. Le seuil de détection est de l'ordre de 10^4 à 10^5 BAAR/ml, ce qui est rarement obtenu chez l'enfant.

4.1.3.2.2. Culture

La culture classique est indispensable dans tous les cas, que l'examen direct soit positif ou non. Elle permet de préciser le type de mycobactérie et sa sensibilité aux différents antituberculeux. *Mycobacterium tuberculosis* est caractérisé par un temps de division long, en moyenne 20 heures. Cette lenteur de croissance et les difficultés de la culture font que les résultats ne sont disponibles que tardivement : entre trois et six semaines avec les méthodes conventionnelles.

La culture rapide : le système Bactec. La respirométrie radiométrique ou système Bactec est une méthode de détection rapide de la croissance. Elle est basée sur la mesure du $14CO_2$ produit par la multiplication des mycobactéries dans un milieu de culture liquide contenant de l'acide palmitique, marqué au 14C comme seule source de carbone. Le $14CO_2$ ainsi libéré est détecté par radiométrie avant l'apparition des colonies. Le délai moyen de détection de la croissance est de huit jours avec ce système (18 jours avec la culture conventionnelle) lorsque le produit pathologique est positif à l'examen microscopique. Il est de 14 jours (26 jours avec la culture conventionnelle) lorsque le produit pathologique est négatif à l'examen microscopique.

Il s'agit d'une méthode chère et radioactive. D'autres méthodes MGIT (*mycobacterial growth indicator tube*) et MB Redox ont été récemment proposées. Elles mettent en évidence la consommation de l'oxygène du milieu corollaire de la croissance et l'objectivent soit par l'apparition d'une fluorescence, soit par celle d'un précipité coloré. Ces techniques et leurs performances sont développées dans chapitre 8.

4.1.3.2.3. Amplification génomique par *polymerase chain reaction* ou PCR

Le diagnostic de la tuberculose par PCR cherche à déceler une mycobactérie du complexe *tuberculosis* en amplifiant des séquences génomiques spécifiques. Il persiste un certain nombre de réactions faussement positives dues à des contaminations lors des manipulations. Par ailleurs, les enzymes utilisés pour la PCR sont très sensibles aux nombreux inhibiteurs présents dans les prélèvements biologiques. Selon la méthode utilisée, la sensibilité se situe entre 60 et 80 % (20 à 40 % de faux négatifs). La spécificité est de l'ordre de 99 % (1 % de faux positifs). Elle ne doit en aucun cas faire abandonner les techniques bactériologiques classiques.

Les études concernant l'utilisation de la PCR dans la tuberculose de l'enfant sont peu nombreuses. Pour Smith, sur 35 cas de tuberculose maladie, la sensibilité de la PCR est comparable à la culture. Delacourt, dans une étude où un contrôle très strict permet une très forte spécificité, rapporte, sur 199 prélèvements concernant 68 enfants, une PCR positive chez 83 % des enfants ayant une tuberculose maladie et chez 39 % de ceux ayant une tuberculose infection.

Actuellement, les contraintes techniques et le coût élevé de cet examen en font réserver les indications aux cas où le diagnostic est difficile ou urgent.

5. Traitement

5.1. Antibiotiques antituberculeux

Les antibiotiques antituberculeux sont décrits dans le Tableau 5.2.

Tableau 5.2
Antituberculeux

Produit Spécialité®	Présentation	Posologie	Effets secondaires
Isoniazide (INH) Rimifon®	Comprimés à 50 mg à 150 mg Ampoules de 5 ml = 50 mg	10 $mg \cdot kg^{-1} \cdot j^{-1}$	Hépatotoxicité (transaminases) Neuropathies périphériques
Rifampicine (RMP) Rifadine®	Gelules à 300 mg Suspension buvable 1 cuillère-mesure de 2,5 ml = 50 mg 1 cuillère-mesure de 5 ml = 100 mg Ampoules de 10 ml = 600 mg	10 à 20 $mg \cdot kg^{-1} \cdot j^{-1}$ Nouveau-né : 10 mg/kg 1 mois–7 ans : 10 à 20 mg/kg 7–15 ans : 10 mg/kg	Augmente l'hépatotoxicité de l'INH Rares accidents immuno-allergiques Colore les urines en rouge orangé Inducteur enzymatique
Rimactan®	Gelules à 300 mg Suspension buvable à 2 % 1 cuillère-mesure = 100 mg		
Pyrazinamide (PZA) Pirilene®	Comprimés à 500 mg	20 à 30 $mg \cdot kg^{-1} \cdot j^{-1}$	Hépatotoxicité Hyperuricémie Arthralgies Rash cutané
Éthambutol (EMB) Myambutol®	Gélules à 400 mg		Névrite optique rétro-bulbaire (dose dépendante)
Dexambutol®	Comprimés à 250 mg Comprimés à 500 mg	15 à 25 $mg \cdot kg^{-1} \cdot j^{-1}$	Rash cutané

5.1.1. Isoniazide

L'isoniazide (INH) (Rimifon®) est un antibiotique bactéricide (il inhibe la synthèse des acides mycoliques) pour les bacilles en phase de croissance. Il est actif sur les germes intra- et extracellulaires. La CMI est de l'ordre de 0,025 à 0,050 µg/ml. La résistance primaire est rare en France (3 %) mais la résistance secondaire chromosomique atteint 17 %. Il est bien absorbé par voie digestive à distance des repas et métabolisé dans le foie après acétylation. Sa concentration sérique et sa demi-vie d'élimination (entre une et six heures) dépendent de la vitesse d'acétylation qui est génétiquement contrôlée. Les taux sériques aux posologies usuelles sont cependant nettement au-dessus des CMI chez les acétyleurs rapides, ce qui rend inutile en pratique courante la mesure de la vitesse d'acétylation. Sa posologie est de 5 à 10 mg/kg. Moins de 10 % des sujets traités par l'INH ont une élévation modérée et transitoire des transaminases. Cette hépatotoxicité est plus fréquente et plus précoce en cas d'association à la rifampicine, justifiant pour certains une surveillance des transaminases au cours des premiers mois. Une élévation des transaminases

à des taux six fois supérieurs à la normale fait interrompre le traitement, celui-ci pouvant être repris après normalisation des enzymes. Le test d'acétylation, c'est-à-dire la recherche de la dose d'INH permettant d'obtenir un taux sérique de 1 à 2 µg/ml trois heures après la prise peut ainsi être proposé dans les seules situations d'élévation importante des transaminases ou d'échec thérapeutique.

5.1.2. Rifampicine

La rifampicine (RMP) (Rifadine®, Rimactan®) est également bactéricide (elle se fixe sur l'ARN-polymérase ADN-dépendante bactérienne et bloque la synthèse des ARN messagers au stade d'initiation). Sa CMI sur le BK est de l'ordre de 0,0005 à 0,2 µg/ml. Elle est active sur les germes intra- et extracellulaires ainsi que sur les germes à multiplication lente dans le caséum. La résistance primaire de *M. tuberculosis* à la RMP est exceptionnelle (0,1 %) mais sa résistance secondaire atteint 11 %. Son absorption digestive est bonne en absence d'aliments. Elle a une bonne diffusion tissulaire. Sa concentration dans le liquide céphalorachidien (LCR) est la moitié de la concentration plasmatique en cas de méningite. Sa demi-vie d'élimination est de deux à cinq heures. Il existe un métabolisme (désacétylation) hépatique suivi d'une excrétion biliaire et d'un cycle entérohépatique. La RMP peut induire une élévation modérée des transaminases et augmente la toxicité de l'INH. Sa posologie est de 10 à 20 mg/kg.

5.1.3. Pyrazinamide

Le pyrazinamide (PZA) (Pirilène®) est bactéricide sur le BK à pH acide, ce qui explique son efficacité sur les bacilles intracellulaires, intramacrophagiques. La résistance primaire est exceptionnelle. La résistance secondaire au PZA prescrit en monothérapie est fréquente. Son absorption digestive est pratiquement complète. Il diffuse bien dans tous les tissus y compris dans le LCR en cas de méningite. Sa demi-vie d'élimination est de neuf heures. Il est métabolisé dans le foie puis éliminé presque exclusivement dans les urines. L'hyperuricémie liée au PZA est dose-dépendante. Une hépatite cytolytique est possible, favorisée par la prescription associée de médicaments épipaléolithiques, en particulier l'INH, ainsi que par une prise prolongée du produit. Elle semble rare chez l'enfant. La posologie est de 20 à 30 mg/kg en une seule prise.

5.1.4. Éthambutol

L'éthambutol (EMB) (Dexambutol®, Myambutol®) est bactériostatique aux doses habituellement utilisées (il inhibe la synthèse d'ARN). Il est actif sur les germes intra- et extracellulaires. La résistance primaire à ce produit est exceptionnelle (moins de 0,1 %). La résistance secondaire est très rare en France (2 %). L'absorption intestinale est bonne (80 %). Sa diffusion dans le LCR est médiocre, y compris en cas d'inflammation méningée. La demi-vie d'élimination sérique est de six à huit heures. La toxicité essentielle est neurologique : névrite optique rétrobulbaire justifiant une surveillance du champ visuel, de la vision des couleurs et de l'acuité visuelle. Elle est dose dépendante, ne survenant que chez moins de 1 % des patients recevant 15 $mg{\cdot}kg^{-1}{\cdot}j^{-1}$ et augmentant pour 25 $mg{\cdot}kg^{-1}{\cdot}j^{-1}$. Son utilisation doit être prudente chez des enfants

trop jeunes pour pouvoir être surveillés sur le plan visuel. Sa posologie est de 15 à 25 $mg{\cdot}kg^{-1}{\cdot}j^{-1}$.

5.2. Conduite pratique du traitement

Pour être efficace, le traitement doit être actif sur les bacilles intra- et extracellulaires, bactéricide, et éviter la sélection de mutants résistants. Il repose sur l'association de plusieurs antituberculeux administrés per os simultanément en une seule prise le matin à jeun pendant un temps suffisamment long. Le problème essentiel est celui de la compliance. Toute tuberculose de l'enfant doit être traitée, qu'il s'agisse d'une tuberculose maladie ou d'une tuberculose infection.

5.2.1. Tuberculose maladie

5.2.1.1. Tuberculose médiastinopulmonaire

Elle repose sur un traitement de six mois comportant l'association INH, RMP, PZA administrés de façon quotidienne pendant deux mois suivis par l'association INH et RMP pendant quatre mois administrés soit de façon quotidienne, soit deux fois par semaine. L'adjonction d'EMB pendant les deux premiers mois est discutée. Certains le prescrivent systématiquement alors que d'autres le réservent aux cas de suspicion de résistance à un antibiotique (patient ayant déjà reçu des antituberculeux, ou exposé à un bacille résistant, ou originaire d'un pays à haute prévalence de résistance). L'administration du traitement deux fois par semaine nécessite de doubler les doses d'INH (10 à 20 $mg{\cdot}kg^{-1}{\cdot}dose^{-1}$) sans modifier la dose de RMP (10 à 20 $mg{\cdot}kg^{-1}{\cdot}dose^{-1}$). Elle a l'avantage de pouvoir être « directement observée », ce qui résoud le problème de la compliance. Ce type de traitement, y compris pendant les deux premiers mois en doublant également les doses de PZA (50 à 60 $mg{\cdot}kg^{-1}{\cdot}dose^{-1}$), s'est avéré aussi efficace que la prise quotidienne des antituberculeux dans une étude indienne avec un suivi de deux ans.
Des spécialités commerciales associent dans le même comprimé soit INH (50 mg), RMP (120 mg) et PZA (300 mg) (Rifater®), soit INH (150 mg) et RMP (300 mg) (Rifinah®). Elles favorisent une meilleure observance mais chez l'enfant, tout particulièrement avec le Rifater®, il peut être nécessaire de compléter la dose d'INH.

5.2.1.2. Tuberculoses disséminées et extrapulmonaires

5.2.1.2.1. Méningite

Elle nécessite une quadrithérapie (INH, RMP, PZA, EMB). Celle-ci peut être prolongée à trois mois. Compte tenu de la mauvaise pénétration méningée de l'EMB, il peut être remplacé par la streptomycine (20 à 40 mg/kg), la bithérapie (INH + RMP) sera prolongée neuf mois. Certains préconisent une quadrithérapie deux mois et une bithérapie dix mois.

5.2.1.2.2. Miliaires tuberculeuses, atteintes osseuses et tuberculose congénitale

Elles seront traitées suivant les mêmes modalités que les méningites.

5.2.1.2.3. Atteintes ganglionnaires périphériques, tuberculoses pleurales, abdominales, génito-urinaires

Même traitement que les formes médiastinopulmonaires.

5.2.1.3. Cas particulier : l'enfant immunodéprimé

Les enfants immunodéprimés, en particulier les enfants infectés par le VIH, doivent recevoir une quadrithérapie en première intention (INH + RMP + PZA + EMB) pendant deux mois, suivie en cas d'évolution favorable d'une bithérapie (INH + RMP) poursuivie six à dix mois. Des interactions médicamenteuses existent avec le kétoconazole : celui-ci est susceptible de diminuer le taux sérique de rifampicine. L'INH peut diminuer le taux sérique de kétoconazole.

5.2.1.4. Indications de la corticothérapie

La place des corticoïdes n'est pas encore parfaitement définie. Elle ne se conçoit qu'en association avec un traitement antituberculeux actif donné quotidiennement dans sa totalité.
Les corticoïdes sont indiqués lorsqu'il existe un trouble de ventilation et/ou une obstruction de constitution récente et/ou une obstruction endobronchique significative (supérieure à 50 %) constatée lors de la fibroscopie (compression extrinsèque ou granulome). L'existence d'une adénopathie latérotrachéale compressive avec une muqueuse fragile reste cependant une contre-indication classique, en raison des risques d'asphyxie par fistulisation qu'une telle corticothérapie pourrait induire.
Ils sont également indiqués dans les atteintes pleurales, les atteintes cérébro-méningées notamment avec hypertension intracrânienne, les miliaires retentissant sévèrement sur les fonctions respiratoires. La posologie est de 1 à 2 $mg{\cdot}kg^{-1}{\cdot}j^{-1}$ de prednisone, suivie d'une baisse progressive.

5.2.1.5. Surveillance du traitement

Une consultation mensuelle au début est indispensable. Outre l'examen clinique, elle doit comporter une évaluation de la compliance. Il est habituel de prescrire avant traitement une numération formule sanguine avec plaquettes, une VS, une créatininémie, une uricémie, des transaminases. Lorsque l'EMB est utilisé, un examen ophtalmologique avec vison des couleurs doit être réalisé chez les enfants capables de l'effectuer. Les contrôles biologiques ultérieurs ne s'imposent qu'en cas de complication. Une nouvelle radiographie du thorax est justifiée un mois, trois mois et six mois après le début du traitement.

5.2.2. Tuberculose infection (primo-infection latente)

Elle nécessite un traitement. Son but est d'éviter l'apparition d'une tuberculose maladie.
L'INH en monothérapie pendant 12 mois a été le premier traitement proposé. Il permet une réduction du risque de 80 % pendant une période de dix ans par rapport à un groupe placebo. Une étude de l'OMS a montré qu'un traitement de six mois réduit le risque de tuberculose maladie de 65 % (75 % pour 12 mois de traitement), la différence n'étant pas significative. Si on ne considère que les personnes compliantes, les taux de protection s'élèvent à 69 % pour un traitement de six mois et 93 % pour 12 mois. Un traitement de 12 mois est plus efficace, mais le traitement de six mois est mieux suivi. L'Académie américaine de pédiatrie recommande une durée de neuf mois.
Afin de pallier les risques d'échec liés à une résistance primaire à l'INH ou à l'apparition de mutants résistants et de réduire la durée du traitement, on peut proposer une bithérapie (INH + RMP) de trois mois.

5.2.3. Traitement des sujets contacts

Les sujets contacts doivent avoir un examen clinique, une radiographie de thorax et une IDR. Le traitement préventif des sujets contacts autour d'un cas de tuberculose contagieux a démontré son efficacité chez l'enfant. Les facteurs qui majorent le risque de contamination sont la durée du contact, sa proximité et l'âge : nourrissons, enfants de moins de quatre ans, adolescents. Il repose sur les mêmes modalités que celui de la tuberculose infection en tenant compte du statut vaccinal.

5.2.3.1. Enfants non vaccinés par le BCG

IDR négative : traitement de trois mois puis nouvelle IDR. Si IDR négative : arrêt du traitement ; si IDR positive : poursuite du traitement six mois si monothérapie.
IDR positive : voir tuberculose infection.

5.2.3.2. Enfants vaccinés par le BCG

Un virage est probable si le diamètre d'induration a augmenté d'au moins 10 mm entre deux tests.
En cas de virage probable : traitement comme une infection.
En cas de virage incertain : l'opportunité d'un traitement ou une simple surveillance seront appréciés au cas par cas.
Si l'IDR est négative : traitement de trois mois, puis nouvelle IDR et application du même schéma que pour les sujets non vaccinés.

5.2.3.3. Cas particulier : le nouveau-né

Un nouveau-né de mère tuberculeuse non ou insuffisamment traitée doit être traité comme ayant une tuberculose maladie quels que soient les résultats de son bilan initial et notamment de son IDR. En cas de négativité persistante de l'IDR après un traitement de trois mois, certains interrompent le traitement et font le BCG ; d'autres poursuivent le traitement jusqu'au 6e mois.

5.2.3.4. Nourrisson de moins de 18 mois

La fréquence des formes disséminées conduit à traiter comme une primo-infection patente toute virage d'IDR et à instituer une bithérapie par INH et RMP en cas de contage familial avec IDR négative. Ce traitement peut être interrompu au bout de trois mois si l'IDR reste négative et si la radiographie de thorax reste normale.

5.2.4. Traitement des tuberculoses à souches résistantes

Pour empêcher la sélection des mutants résistants, il est nécessaire d'administrer simultanément plusieurs antituberculeux. La sélection de souches multirésistantes (résistance combinée à l'INH et à la RMP) est la conséquence directe d'erreurs thérapeutiques ou de la mauvaise compliance au traitement prescrit. Ce traitement doit être prescrit et suivi par des équipes spécialisées.

Pour en savoir plus

Dolin PJ, Raviglione MC, Kochi A. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. Bull World Health Organ 1994 ; 72 : 213-20.

Gaudelus J, Camard O, Belasco C, Muller MH. Épidémiologie de la tuberculose en France. Quelle place pour l'enfant ? In : Pons G, Gendrel D, Grosset J, Eds. Paris : Springer-Verlag ; 1998. p. 23-9.

Decludt B, Campese C. Les cas de tuberculose déclarés en France en 2000. Bull Epidemiol Hebd 2002 ; 16-17 : 68-70.

Decludt B. Infection et maladie tuberculeuse de l'enfant en Île-de-France en 1997. Institut de veille sanitaire. Décembre 2000.

Smith KC. Tuberculosis in children. Curr Probl Pediatr 2001 ; 31 : 5-30.

Delacourt C, Mani TM, Bonnerot V, de Blic J, Sayeg N, Lallemand D, et al. Computed tomography with normal chest radiograph in tuberculous infection. Arch Dis Child 1993 ; 69 : 430-2.

De Blic J, Azevedo I, Burren CP, Le Bourgeois M, Lallemnad D, Scheinmann P. The value of fiberoptic bronchoscopy in childhood pulmonary tuberculosis. Chest 1991 ; 100 : 688-92.

Hussey G, Chisholm T, Kibel M. Miliary tuberculosis in children : a review of 94 cases. Pediatr Infect Dis J 1991 ; 10 : 832-6.

Waecker NJ, Connor JD. Central nervous system tuberculosis in children : a review of 30 cases. Pediatr Infect Dis J 1990 ; 9 : 539-43.

Doerr CA, Starke JR, Ong LT. Clinical and public health aspects of tuberculosis meningitis in children. J Pediatr 1995 ; 127 : 27-33.

Johnson CA, Hill ID, Bowie MD. Abdominal tuberculosis in children. South Afr Med J 1987 ; 72 : 20-2.

Valejo JG, Ong LT, Starke JR. Tuberculous osteomyelitis of the long bones in children. Pediatr Infect Dis J 1995 ; 14 : 542-6.

Hugo-Hamman CT, Scher H, De Moor MM. Tuberculous pericarditis in children : a review of 44 cases. Pediatr Infect Dis J 1994 ; 13 : 13-8.

Mazade MA, Evans EM, Starke JR, Correa AG. Congenital tuberculosis presenting as sepsis syndrome : case report and review of the literature. Pediatr Infect Dis J 2001 ; 20 : 439-42.

Vallejo JG, Ong LT, Starke JR. Clinical features, diagnosis and treatment of tuberculosis in infants. Pediatrics 1994 ; 94 : 1-7.

Chan SP, Birnbaum J, Rao M, Steiner P. Clinical manifestation and outcome of tuberculosis in children with acquired immuno-deficiency syndrome. Pediatr Infect Dis J 1996 ; 15 : 443-7.

Inselman LS. Tuberculosis in children : an update. Pediatr Pulmonol 1996 ; 21 : 101-20.

Starke JR. Multidrug therapy for tuberculosis in children. Pediatr Infect Dis J 1990 ; 785-93.

Kumar L, Ohand R, Singhi PD, et al. A randomized trial of fully-intermittent and daily-followed by intermittent short-course chemotherapy for childhood tuberculosis. Pediatr Infect Dis J 1990 ; 9 : 802-6.

Begue P. Traitement préventif de la tuberculose chez l'enfant contact. Éléments décisionnels et modalités thérapeutiques. Med Mal Infect 1995 ; 25 : 384-7.

Martin C, Denis F. *Mycobacterium tuberculosis*. In : Denis F, Ed. Les bactéries, champignons et parasites transmissibles de la mère à l'enfant. Paris : John Libbey Eurotext ; 2002. p. 199-214.

Mycobacterium tuberculosis et mycobactéries atypiques

Chapitre 6

Mycobacterium ulcerans, agent de l'ulcère de Buruli

Hélène Marchandin, Françoise Portaels, Philippe Van de Perre

Mycobacterium ulcerans est une mycobactérie à croissance lente responsable d'ulcérations cutanées invalidantes regroupées sous le terme d'ulcère de Buruli ou ulcère de Bairnsdale. En 1998, *M. ulcerans* a été reconnu bactérie pathogène émergente par l'Organisation mondiale de la santé.

1. Importance de l'ulcère de Buruli et principales voies de recherche

L'ulcère de Buruli se situe au troisième rang des infections mycobactériennes chez l'homme après la tuberculose et la lèpre et connaît actuellement une recrudescence en zone intertropicale. Lors de ces dernières années, les taux de détection de la maladie se sont avérés souvent supérieurs à ceux de la lèpre et parfois localement supérieurs à ceux de la tuberculose. Si les premiers cas d'ulcère de Buruli ont été observés dès 1897 par Cook en Ouganda, les travaux de recherche concernant cette maladie et son agent infectieux sont de réalisation relativement récente et s'articulent autour de plusieurs axes visant pour la majorité d'entre eux à améliorer les connaissances épidémiologiques et les moyens de traitement de l'ulcère de Buruli.

2. Particularités de *M. ulcerans* et données inconnues

M. ulcerans présente un certain nombre de particularités qui font de cette espèce un membre à part au sein de la famille des mycobactéries. *M. ulcerans* est une mycobactérie extracellulaire dans la phase active de la maladie, qui possède une séquence d'insertion spécifique, l'IS*2404*, et qui produit une toxine lipidique, nécrosante et immunosuppressive, la mycolactone. Toutefois, de nombreuses données sont encore inconnues. En effet, bien que le rôle de certains insectes aquatiques soit actuellement une des voies vraisemblables de transmission de *M. ulcerans*, le mode de transmission et le réservoir naturel de *M. ulcerans* n'ont toujours pas été totalement élucidés malgré de nombreuses investigations menées dans ce sens. La voie de biosynthèse de la mycolactone reste également à explorer.

Des études génomiques ont permis de démontrer que *M. ulcerans* aurait évolué à partir de *M. marinum*. Sur un plan phylogénétique, ces deux espèces sont les plus proches de *M. tuberculosis*. Les similarités observées au niveau génétique contrastent donc de manière très importante avec les différences observées tant au niveau phénotypique qu'au niveau clinique.

3. Épidémiologie

3.1. Distribution géographique, fréquence, âge et sexe

Les premiers cas d'ulcère de Buruli sont rapportés par Sir Albert Cook en 1897 qui les observe en Ouganda. Toutefois, le premier cas publié est un cas australien décrit en 1948 dans la région de Bairnsdale par MacCallum qui

relie l'infection à la présence de bacilles acido-alcoolo-résistants. Le nom d'ulcère de Buruli sera attribué à la maladie en référence au nom d'une région d'Ouganda où de nombreux cas ont été décrits dans les années 1950. L'ulcère de Buruli, ou ulcère de Bairnsdale, est actuellement présent sur quatre continents (Amérique, Afrique, Asie et Océanie) et touche une trentaine de pays situés en zone intertropicale (Fig. 6.1). La maladie sévit principalement en Afrique et en Australie et continue de s'étendre particulièrement en Afrique de l'Ouest sous forme endémique. Plusieurs cas ont été décrits en dehors de la zone intertropicale (en Amérique et en Europe) chez des voyageurs ou des personnes ayant travaillé en zone d'endémie. Quelques cas ont également été rapportés en Chine, au Japon et dans le sud de l'Australie (Fig. 6.1).

La fréquence de l'ulcère de Buruli est vraisemblablement encore largement sous-estimée puisque les données épidémiologiques ne tiennent compte que du dépistage passif des patients se présentant à un dispensaire. Cette maladie sévissant souvent dans des zones reculées, il est probable que beaucoup de patients ne consultent pas les services de santé et préfèrent le recours à la médecine traditionnelle. Les derniers rapports font état d'un cumul de 158 cas australiens et 15 037 cas africains en 1999. Les pourcentages de patients



Figure 6.1. Répartition mondiale des cas d'ulcère de Buruli.
Les points noirs représentent la trentaine de pays touchés par la maladie : Angola, Australie, Bénin, Bolivie, Burkina Faso, Cameroun, Chine, Congo, Côte d'Ivoire, Gabon, Ghana, Guinée, Guinée équatoriale, Guyane française, Inde, Indonésie, Japon, Kiribati, Liberia, Malaisie, Mexique, Nigéria, Ouganda, Papouasie-Nouvelle Guinée, Pérou, République démocratique du Congo, Sierra Leone, Sri Lanka, Soudan, Surinam, Togo.

atteints de la maladie au sein de certaines communautés peuvent être très élevés, jusqu'à 22 % dans une communauté au Ghana. Les cas sont le plus souvent observés en zone rurale et, dans plus de 50 % des cas, chez les enfants d'âge inférieur à 15 ans. Chez les adultes, les femmes sont plus souvent atteintes que les hommes.

L'infection par le VIH ne semble pas être un facteur de risque d'acquisition de l'ulcère de Buruli si l'on considère le faible nombre de co-infections par le VIH et *M. ulcerans* qui sont observées mais elle jouerait un rôle péjoratif sur l'évolution clinique des formes ostéomyélitiques.

3.2. Influence de l'environnement et mode de transmission

Le réservoir de *M. ulcerans* ainsi que son mode de transmission à l'homme sont longtemps demeurés totalement inconnus. Le biotope hydrotellurique fut en premier suspecté d'être étroitement lié à la survenue de cas endémiques de la maladie, ceux-ci étant principalement observés dans des zones géographiques peu drainées, marécageuses, éventuellement après survenue d'inondations importantes. La recrudescence du nombre de cas d'ulcère de Buruli observés dans certaines régions après réalisation de divers travaux de déforestation ou de construction s'accompagnant de modifications de l'environnement naturel (construction de canaux d'irrigation pour la riziculture au Bénin, construction de barrages ou création de lacs artificiels, création d'un terrain de golf irrigué par des eaux usées en Australie...) a permis de confirmer le lien entre la survenue de la maladie et le biotope hydrotellurique. Toutefois, un contact direct avec le milieu aquatique n'est pas strictement indispensable à l'infection par *M. ulcerans*.

Dans un second temps, différentes techniques de PCR ont été appliquées à la recherche du réservoir environnemental de *M. ulcerans*. Elles ont permis la détection de séquences nucléotidiques spécifiques de *M. ulcerans* dans l'environnement (eau, boues, détritus, végétaux aquatiques, poissons et insectes) sans que l'on puisse toutefois isoler les souches bactériennes en culture. Des infections naturelles sont décrites chez l'animal en Australie (koala, opossum, alpaga), les lésions étant identiques à celles observées chez l'homme.

L'élucidation du mode de transmission de l'ulcère de Buruli est actuellement en progression grâce à des travaux réalisés sur les insectes et des mollusques aquatiques suspects d'être respectivement vecteurs et réservoirs de *M. ulcerans*. Ces travaux, conduits par Marsollier et al., reposent sur deux types d'observations : tout d'abord, la détection par PCR des séquences IS*2404*, à ce jour reconnues comme étant spécifiques de *M. ulcerans*, dans des broyats de certains insectes capturés en Côte d'Ivoire et, pour la première fois, l'isolement en culture de deux souches de *M. ulcerans* à partir de ces broyats. Ensuite, des travaux d'infection en laboratoire de certaines punaises d'eau par *M. ulcerans* ont permis de démontrer que les mycobactéries étaient localisées dans les glandes salivaires de ces insectes sans apparition de lésions des tissus infectés. Ces punaises d'eau appartiennent à l'espèce *Naucoris cimicoides*, elles sont carnivores et peuvent transmettre l'infection à la souris dans un modèle expérimental. Toutefois, ces insectes ne peuvent s'infecter directement à partir des végétaux aquatiques contaminés et l'intervention d'un hôte intermédiaire dans la chaîne de transmission de *M. ulcerans* est fortement suspectée ;

cet hôte pourrait être représenté par des mollusques herbivores. De même, le rôle d'autres insectes aquatiques dans cette transmission reste à explorer. L'ulcère de Buruli constitue la première mycobactériose dont un des modes de transmission implique des insectes. Le rôle de certains organismes, comme des petits poissons, crustacés, mollusques et amibes, dans la filtration et/ou la concentration de *M. ulcerans* a été évoqué mais jamais démontré. Dans l'état actuel des connaissances, le mode de transmission *de M. ulcerans*, bien que non totalement élucidé, pourrait être schématisé comme dans la Fig. 6.2. Les insectes aquatiques capables de voler pourraient être à l'origine de la

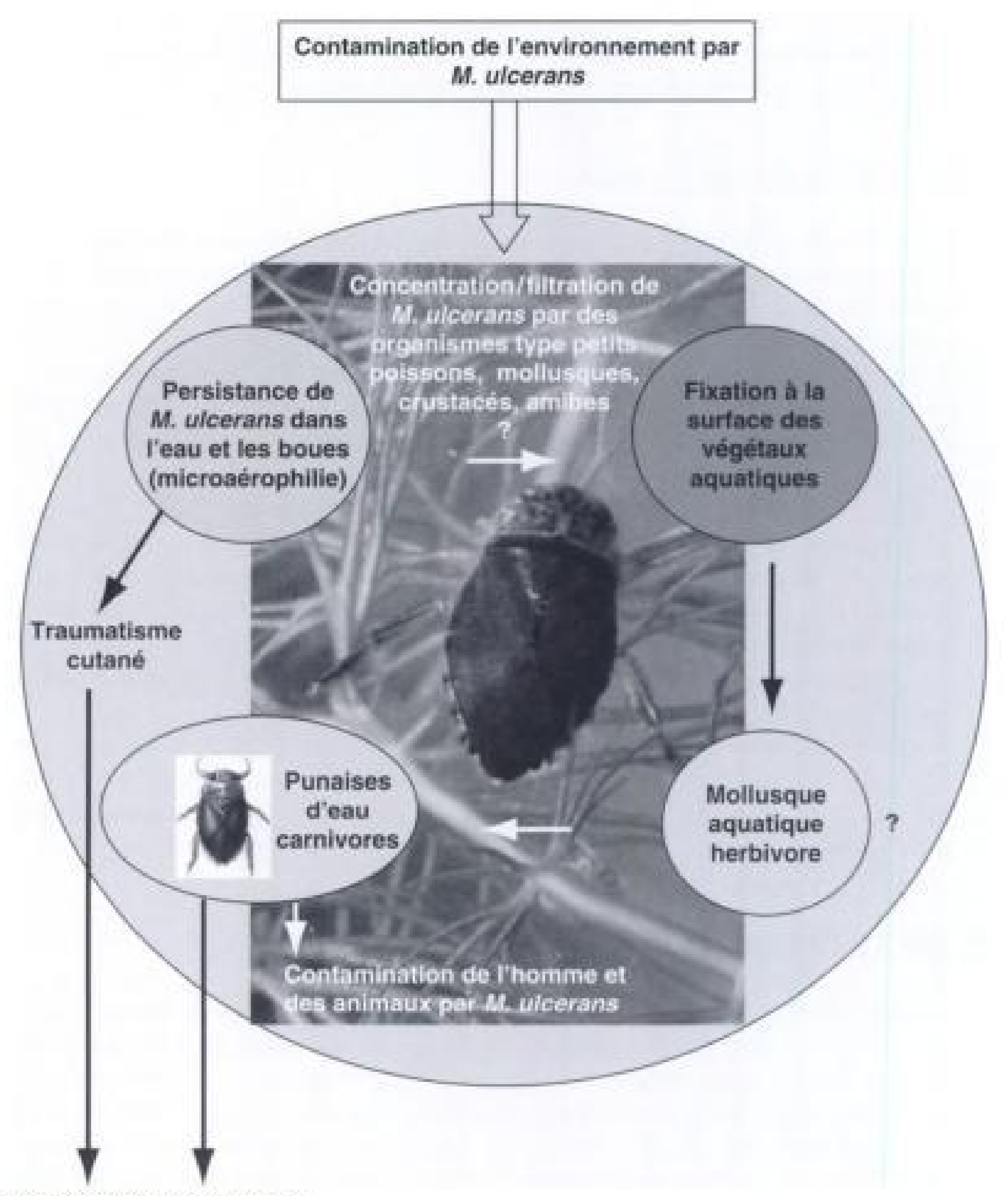


Figure 6.2. Représentation schématique de l'état actuel des connaissances sur le mode de transmission de *M. ulcerans*.

contamination de l'homme et des animaux soit dans le milieu aquatique, soit dans le milieu extérieur.
L'existence d'autres voies de contamination reste à explorer comme la contamination aérienne après formation d'aérosols. La contamination passe donc souvent inaperçue. Elle se fait par voie transcutanée, que ce soit après piqûre d'insectes ou par un autre mécanisme traumatique, l'existence d'un traumatisme étant un facteur de risque pour l'acquisition de cette infection. La transmission interhumaine est exceptionnelle. Plusieurs cas font état de la survenue de lésions d'ulcère de Buruli sur le site d'un traumatisme cutané, par exemple après une injection hypodermique, un coup de fusil, une blessure par pierre ou une écharde. Récemment, un cas d'ulcère de Buruli a été décrit après morsure humaine, la morsure ayant uniquement permis l'inoculation des tissus sous-jacents par *M. ulcerans* préalablement présent à la surface cutanée.

3.3. Épidémiologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire appliquées à des fins épidémiologiques n'ont malheureusement pas permis de faire progresser les connaissances dont nous disposons sur le mode de transmission de la maladie et ce, pour deux raisons principales :
– jusqu'à très récemment, aucune souche isolée de l'environnement n'était disponible et donc aucune comparaison entre les souches isolées de l'environnement et celles cultivées à partir des prélèvements cliniques n'avait pu être réalisée ;
– diverses techniques ont été appliquées au typage des isolats cliniques de *M. ulcerans* : amplification de séquences répétées dans le génome bactérien par rep-PCR, électrophorèse en champ pulsé, ribotypage, analyse du polymorphisme de taille des fragments de restriction après amplification de la séquence d'insertion spécifique de *M. ulcerans* : IS*2404*-RFLP, polymorphisme des fragments amplifiés par PCR aléatoire ou *amplified fragment length polymorphism* (AFLP).
Aucune de ces techniques n'a jusqu'alors permis une discrimination suffisante entre les isolats pour contribuer aux études épidémiologiques sur l'ulcère de Buruli. En effet, seuls les isolats provenant de différents continents ont pu être distingués.

4. Aspects cliniques

L'ulcère de Buruli est une infection chronique nécrosante de la peau et de la graisse sous-cutanée qui évolue en trois phases : une phase pré-ulcérative sous la forme d'un nodule, un placard ou un œdème indolore sans signes généraux d'infection, une phase ulcérative avec de vastes ulcérations cutanées et une phase de cicatrisation, pas toujours spontanée, qui engendre des séquelles parfois très invalidantes (Fig. 6.3, voir atlas couleurs page 294).
À côté de cette forme « classique », qualifiée par certains auteurs de « nouvelle lèpre », deux autres formes sont de plus en plus fréquemment décrites : des formes mixtes ou multifocales associant des nodules ou des placards à des ulcérations et des formes disséminées ou à localisation osseuse,

particulièrement graves à cause des complications de type ostéomyélitique (jusqu'à 14 % des cas) pouvant conduire à des amputations (Fig. 6.3, voir atlas couleurs page 294).

Le siège des lésions est principalement localisé aux membres, les membres inférieurs étant au moins deux fois plus souvent atteints que les membres supérieurs. Les lésions de la tête et du tronc ne représentent qu'environ 8 % des lésions recensées d'ulcère de Buruli. Enfin, les paumes des mains et les plantes des pieds ne sont quasiment jamais le siège des ulcérations dues à *M. ulcerans* bien qu'au premier rang des parties du corps exposées à l'environnement. Des cas récurrents ont été décrits. Les lésions surviennent soit sur les parties du corps atteintes initialement (environ 5 à 30 % des cas selon les études) et sont attribuées à une excision chirurgicale insuffisante, soit à distance de la ou des lésion(s) initiale(s) à la suite d'une dissémination par voie hématogène ou lymphatique. La sévérité et le type des lésions semblent être variables selon les régions géographiques considérées ; ainsi, les formes en plaques et les ostéomyélites sont actuellement décrites sur le continent africain exclusivement. Il semblerait donc que des différences de niveau de virulence existent entre les isolats, les souches africaines étant les plus virulentes par rapport aux souches d'Amérique du Sud, d'Australie et de Chine.

Quoi qu'il en soit, les répercussions économiques, sociales et familiales de ces lésions sont très importantes puisque les séquelles engendrées par la maladie rendent les patients handicapés physiques permanents. De plus, l'absence de fièvre et le caractère indolore de la lésion initiale entraînent un diagnostic relativement tardif, celui-ci étant posé dans plus de 95 % des cas au stade ulcéré, c'est-à-dire à un stade nécessitant une intervention chirurgicale relativement lourde avec ablation des tissus nécrosés.

5. Pathogénie

À ce jour, les connaissances ne nous permettent pas de savoir si toutes les personnes infectées développeront la maladie. Toutefois, lorsque l'ulcère de Buruli se déclare, la pathogenèse de la maladie peut être schématisée comme dans la Fig. 6.4. Une fois introduit dans le tissu sous-cutané, *M. ulcerans* prolifère et élabore une toxine ayant une affinité pour les tissus graisseux. La nécrose qui en résulte constitue un excellent terrain pour la prolifération de *M. ulcerans*, lui permettant dans certains cas d'atteindre l'os par contiguïté. La toxine produite par *M. ulcerans* a été purifiée et caractérisée ; son rôle dans la virulence des souches de *M. ulcerans* et la pathogenèse de l'ulcère de Buruli est majeur. Il s'agit d'une toxine lipidique dont la structure est celle d'un macrolide dérivé d'un polykétide. Cette toxine nécrosante, immunosuppressive et cytostatique a été appelée mycolactone. Il s'agit de la première toxine de ce type purifiée à partir d'une bactérie pathogène. Récemment, Small et al. ont démontré qu'il existe en fait plusieurs variants de la mycolactone, retrouvés chez des isolats d'origines géographiques différentes, sans toutefois pouvoir relier la production de ces variants à un niveau de virulence particulier des isolats les produisant ou à la gravité de l'ulcère de Buruli engendré. Très récemment, Stinear et al. ont identifié les bases génétiques de la mycolactone en découvrant six gènes nécessaires et suffisants à la synthèse de cette toxine

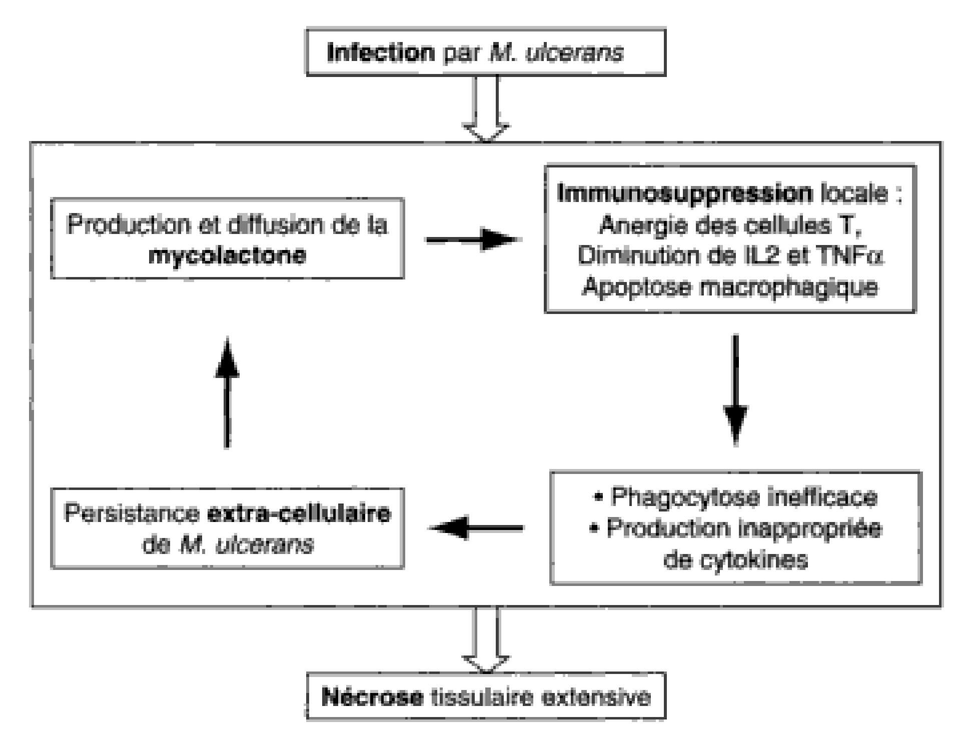


Figure 6.4. Représentation schématique de l'état actuel des connaissances sur l'implication de la mycolactone dans la pathogenèse de l'ucère de Buruli.

et en caractérisant le plasmide portant ces gènes. Cette découverte représente une avancée importante des connaissances sur l'ulcère de Buruli car elle démontre pour la première fois que la virulence d'une mycobactérie peut être à médiation plasmidique, identifiant ainsi une nouvelle cible potentielle dans la lutte contre l'ulcère de Buruli. De nombreux travaux sont actuellement en cours de réalisation pour identifier la voie de biosynthèse de cette toxine mais aussi pour évaluer les perspectives vaccinales que peut offrir cette molécule. Au cours de la phase de nécrose, la réponse immunitaire de l'hôte est incapable de détruire *M. ulcerans*, et l'intradermoréaction à la buruline, un extrait brut de lysat de *M. ulcerans*, reste négative. Le mécanisme de survenue de la phase de cicatrisation demeure inconnu. À ce stade, l'intradermoréaction à la buruline se positive, ce qui suggère que l'hôte est alors en mesure de développer une réaction immunitaire à médiation cellulaire.
L'implication d'autres facteurs de virulence dans la pathogenèse de l'ulcère de Buruli semble tout à fait probable. En effet, des activités enzymatiques phospholipase C et phospholipase D, déjà associées à la virulence de plusieurs autres espèces de mycobactéries, ont été mises en évidence chez *M. ulcerans*.

6. Diagnostic

6.1. Diagnostic clinique

La diversité des formes cliniques de l'ulcère de Buruli rend le diagnostic clinique relativement délicat, surtout en ce qui concerne les formes non ulcérées. Toutefois, ce diagnostic peut être posé par du personnel soignant expérimenté

travaillant en zone d'endémie d'ulcère de Buruli. Pour chacune des présentations cliniques de l'ulcère de Buruli, de nombreux diagnostics différentiels sont à envisager, que ceux-ci soient d'origine infectieuse bactérienne (actinomycose, autres mycobactérioses...) ou parasitaire (leishmaniose, onchocercose...) ou d'origine non infectieuse (ulcères phagédéniques, ulcères veineux, kystes, lymphadénites, cancers...).
Ce diagnostic clinique repose essentiellement sur l'aspect et le site des lésions, leur caractère souvent indolore, mais aussi sur l'âge des patients, leur lieu d'habitation et la notion d'un éventuel séjour en zone d'endémie (Tableau 6.1).

6.2. Diagnostic biologique

Il comprend deux volets : l'examen histopathologique et le diagnostic bactériologique. Le développement de différentes techniques de biologie moléculaire appliquées au diagnostic biologique de l'ulcère de Buruli a permis de raccourcir le délai d'obtention des premiers résultats, mais ces techniques ne sont pas à la portée de tous les laboratoires, notamment dans les pays en voie de développement. De plus, le diagnostic histopathologique et/ou bactériologique traditionnel reste indispensable pour confirmer l'existence de foyers d'ulcère de Buruli dans des régions jusque-là considérées comme non endémiques.
Toutefois, que ce diagnostic fasse appel aux techniques traditionnelles ou aux techniques moléculaires, certaines étapes sont capitales afin de rendre le diagnostic possible : il s'agit principalement de la qualité de l'échantillon à

Tableau 6.1
Éléments du diagnostic de l'ulcère de Buruli

Critères cliniques : en zone d'endémie, ils peuvent suffire à une personne expérimentée pour poser le diagnostic d'ulcère de Buruli	
• Habitat, séjour ou voyage en zone d'endémie	Zone intertropicale
• Âge du patient	Enfant d'âge inférieur à 15 ans
• Localisation des lésions	Membres, principalement les membres inférieurs
• Aspect caractéristique des lésions	Nodule, papule, placard, ulcérations plus ou moins vastes à bords décollés, souvent indolores...
Critères biologiques : le diagnostic d'ulcère de Buruli sera posé si au moins deux des quatre critères suivants s'avèrent positifs	
• Examen direct après coloration de Ziehl-Neelsen	Présence de BAAR, localisation essentiellement extracellulaire
• Culture	Positive à *M. ulcerans* : culture lente, à 32 °C, scotochromogène, résistante à l'isoniazide...
• Aspect histopathologique	Nécrose extensive, panniculite, cellules graisseuses fantômes, vascularite, amas de BAAR
• PCR spécifique de *M. ulcerans* (IS*2404*)	Obtention d'un amplicon de taille attendue

analyser, des conditions de transport des échantillons au laboratoire et des conditions de culture.

6.2.1. Prélèvements

Le prélèvement à réaliser dépend de la forme clinique de l'ulcère de Buruli. D'une manière générale, il convient d'éviter le recueil des exsudats cutanés par écouvillonnage, l'examen microscopique de ce type de prélèvement présentant une sensibilité relativement faible.
Les lésions non ulcératives sont excisées et le prélèvement se fera au centre présumé des lésions.
Pour les lésions ulcératives, les prélèvements de choix sont des biopsies de la base nécrosée et des bords creusés de l'ulcère comprenant du tissu sous-cutané. En cas d'infection osseuse, des prélèvements obtenus par curetage osseux sont recommandés.

6.2.2. Diagnostic anatomopathologique

Il permet l'obtention de résultats dans des délais relativement brefs. Les tissus prélevés doivent être fixés dans du formol. Les coupes et les colorations sont réalisées par les méthodes habituelles utilisant notamment les colorations à l'hématoxyline-éosine et au Ziehl-Neelsen. Les analyses histopathologiques révèlent une ulcération de l'épiderme avec une néo-épithélisation des bords de l'ulcère, le derme et le tissu sous-cutané montrent des zones de nécrose extensive, le pannicule adipeux est inflammatoire et les cellules graisseuses apparaissent comme des cellules fantômes, les parois des vaisseaux sanguins sont épaissies et leur lumière rétrécie, des amas de bacilles peuvent être observés (Fig. 6.5, voir atlas couleurs page 295).

6.2.3. Diagnostic bactériologique

6.2.3.1. Transport au laboratoire

La température optimale de croissance de *M. ulcerans* est de 32 °C. Toutefois, *M. ulcerans* est très sensible aux températures plus élevées qui peuvent soit le tuer, soit retarder sa croissance déjà lente. La température lors du transport vers le laboratoire joue donc un rôle critique, notamment pour les échantillons recueillis dans les pays tropicaux. Le transport au laboratoire doit être rapide. Les meilleurs résultats de cultures sont obtenus lorsque les échantillons sont mis en culture directement après leur prélèvement (> 80 % de positivité). Si les échantillons ne peuvent être traités dans la journée, ils devront être conservés à +4 °C ou mieux l'utilisation d'un milieu de transport sera vivement conseillée. La congélation n'est pas recommandée car *M. ulcerans* est très sensible aux cycles de congélation et de décongélation. Trois milieux de transports adaptés à *M. ulcerans* sont actuellement disponibles (S, P et P5). Ces trois milieux sont des milieux de Dubos rendus sélectifs par adjonction d'antibiotiques. Seul le milieu P5 est un milieu semi-solide permettant le maintien de faibles teneurs en oxygène favorisant la culture de *M. ulcerans* et permettant l'obtention de cultures positives jusqu'à sept semaines après le prélèvement, contre trois semaines pour les deux autres types de milieux de transport. Ces trois milieux donnent des résultats comparables avec environ

40 % de cultures primaires positives. Le succès des cultures primaires ne dépend pas du temps passé dans le milieu de transport, mais du nombre de bacilles acido-alcoolo-résistants viables présents initialement dans l'inoculum.

6.2.3.2. Méthodes de décontamination

La viabilité de *M. ulcerans* est affectée par toutes les méthodes de décontamination actuellement utilisées pour son isolement à partir d'échantillons cliniques. Le choix de la méthode sera donc adapté au cas par cas, en fonction du taux de contamination potentiel des échantillons à analyser. La technique utilisant la N-acétyl-L-cystéine, bien que tuant environ 30 % des bacilles, donne les meilleurs résultats.

6.2.3.3. Examen direct

Les techniques classiquement utilisées pour les autres mycobactéries, coloration de Ziehl-Neelsen et à l'auramine, permettent la mise en évidence d'amas de bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR) dans les échantillons analysés (Fig. 6.6, voir atlas couleurs page 295). Leur localisation est principalement extracellulaire. Elles permettront également de confirmer le caractère acido-alcoolo-résistant et d'observer la morphologie bactérienne à partir des cultures (Fig. 6.7B et C, voir atlas couleurs pages 295, 296).

6.2.3.4. Culture

M. ulcerans est une mycobactérie à croissance lente qui présente un certain nombre d'exigences et de préférences culturales (température, teneur en oxygène). Le diagnostic bactériologique de l'ulcère de Buruli par culture est donc délicat. La culture primaire de *M. ulcerans* à partir des échantillons cliniques reste difficile, les pourcentages de cultures primaires positives étant étroitement corrélés à la qualité du prélèvement, ainsi qu'aux conditions de conservation et de transport des échantillons. Quelle que soit la technique utilisée, la température optimale de développement de *M. ulcerans* est de 32 °C (30–33 °C) et il ne se cultive pas, à l'exception de très rares souches, à 37 °C ;
La culture de *M. ulcerans* peut être réalisée :
– sur milieu de Löwenstein-Jensen : les colonies obtenues sont rugueuses et jaunâtres (Fig. 6.7A, voir atlas couleurs page 295). La croissance visible de la bactérie nécessite le plus souvent six à huit semaines d'incubation à 32 °C ;
– en milieu liquide dans le système Bactec® : l'obtention de cultures primaires positives sera optimisée par adjonction dans le milieu de culture de jaune d'œuf à la concentration finale de 1,25 % et par application d'une atmosphère de culture dont la teneur en oxygène est réduite à 2,5 %.
La culture est donc longue, délicate et non contributive au diagnostic qui est essentiellement clinique. Cependant, il reste très important de pouvoir cultiver *M. ulcerans* à partir de différents prélèvements d'origine environnementale, animale ou humaine afin de mieux comprendre l'épidémiologie de cette infection.

6.2.3.5. Tests culturaux et biochimiques d'identification de *M. ulcerans*

M. ulcerans est une mycobactérie à croissance lente : six à huit semaines pour les cultures primaires, environ 15 jours pour les subcultures. Les colonies sont pigmentées en jaune et les tests de photoréactivité montrent que la bactérie est

scotochromogène, la pigmentation se développant que les cultures soit placées dans l'obscurité ou à la lumière (Fig. 6.7A, voir atlas couleurs page 295). Elle ne réduit pas les nitrates et ne possède pas de catalase. L'hydrolyse du Tween 80 est négative. Elle est résistante à l'isoniazide et sensible à l'hydroxylamine et au p-nitrobenzoate. Certaines souches africaines possèdent en outre une activité enzymatique de type phosphatase acide.

6.2.3.6. Techniques moléculaires

Depuis 1997, différentes techniques d'amplification génique par PCR ont été appliquées au diagnostic des infections à *M. ulcerans*. La principale est basée sur l'amplification d'une portion du gène codant pour l'IS*2404* après une étape de lyse thermo-alcaline de la bactérie puis une étape d'extraction et de purification de l'ADN. Outre la rapidité d'obtention des résultats, cette technique présente une spécificité de 100 % et une sensibilité de 96 % par rapport à la culture. Elle est également très utile pour établir le diagnostic quand la culture et les analyses histopathologiques sont négatives pour *M. ulcerans*. Comme pour toutes les techniques d'amplification génique, ce diagnostic moléculaire nécessite un matériel spécifique, des locaux adaptés et du personnel qualifié. Les principaux inconvénients sont la possibilité d'obtention de résultats faussement négatifs dus à la présence éventuelle d'inhibiteurs de l'amplification et, à l'inverse, la possibilité d'obtention de résultats faussement positifs par contamination des prélèvements.

6.2.4. Interprétation

Compte tenu des limites de chacune des techniques de diagnostic biologique, notamment de la sensibilité variable de ces techniques selon le stade clinique, le diagnostic biologique d'ulcère de Buruli ne sera posé que si au moins deux des critères suivants s'avèrent positifs :

– présence de BAAR sur frottis coloré par la méthode de Ziehl-Neelsen ;
– culture positive à *M. ulcerans* ;
– histopathologie évocatrice des biopsies ;
– obtention d'un signal d'amplification par PCR spécifique de *M. ulcerans*.

Une synthèse des critères cliniques et biologiques permettant de poser le diagnostic d'ulcère de Buruli est présentée dans le Tableau 6.1.

6.2.5. Diagnostic biologique indirect

Peu de données sont actuellement disponibles sur la réponse immunitaire des patients à l'infection par *M. ulcerans* et il n'existe, à ce jour, aucun test sérologique permettant de diagnostiquer une telle infection. Deux protéines de 70 kDa et 38/36 kDa, identifiées récemment, constitueraient deux antigènes candidats pour le développement d'un test sérologique spécifique de *M. ulcerans*.

7. Traitement

7.1. Traitement chirurgical

Actuellement, seul le traitement chirurgical a une efficacité prouvée. Il ne peut cependant être réalisé que dans certains centres médicaux disposant de

plateaux techniques et de personnel spécialisés. Il comprend l'excision des lésions puis des sutures pour les lésions non ulcérées localisées, ou l'ablation des tissus malades suivie de greffes cutanées pour les ulcères et les lésions non ulcérées étendues (œdèmes, plaques). Cependant, pour les malades présentant un stade très avancé d'ulcère de Buruli avec atteintes osseuses, l'ablation des tissus atteints nécessite parfois l'amputation. Les hospitalisations ainsi que la rééducation sont alors longues, l'incapacité physique définitive et les conséquences économiques et sociales préjudiciables tant pour le malade que pour sa famille.
La physiothérapie est indispensable pour éviter les cicatrices rétractiles et les déformations des membres, l'utilisation d'attelles de posture est notamment conseillée ; des interventions chirurgicales réparatrices peuvent être envisagées dans les cas les plus invalidants, incluant les cas d'atteinte faciale ou génitale.

7.2. Traitement médicamenteux

M. ulcerans est sensible aux thérapeutiques antimycobactériennes traditionnelles, à l'exception de l'isoniazide et de l'éthambutol, ainsi que de la clofazimine utilisée dans le traitement de la lèpre. L'efficacité de plusieurs molécules antimycobactériennes a été testée in vitro sur diverses souches de *M. ulcerans*. Ces études ont démontré que la rifampicine, la clarithromycine, l'amikacine, l'ofloxacine, la sparfloxacine et la ciprofloxacine présentaient une activité in vitro sur *M. ulcerans*. D'autres études menées in vivo chez la souris ont démontré l'inefficacité de la sparfloxacine et de la minocycline ; elles ont également souligné que l'activité de la clarithromycine sur *M. ulcerans* était uniquement bactériostatique, des infections survenant chez la souris à l'arrêt du traitement. Seules la rifabutine, la rifampicine, la streptomycine et l'amikacine constitueraient donc des candidats potentiels pour le traitement antibiotique de l'ulcère de Buruli chez l'homme. D'une manière générale, ces antibiotiques sont considérés comme inefficaces dans les stades tardifs d'ulcère de Buruli. Cette inefficacité semble principalement liée à une mauvaise diffusion des antibiotiques dans les tissus adipeux sous-cutanés peu vascularisés et nécrosés dans lesquels se localise *M. ulcerans*.
Cependant, ces antibiotiques, utilisés en association, peuvent arrêter la progression de la maladie s'ils sont administrés à un stade précoce. Ils sont également utilisés en peropératoire pour éviter la dissémination par voie hématogène de l'infection. En postopératoire, ces traitements pourraient également prévenir les rechutes.

7.3. Autres traitements liés aux caractéristiques de *M. ulcerans*

La sensibilité à la chaleur de *M. ulcerans* a conduit à envisager l'utilisation de températures élevées pour traiter les lésions d'étendue limitée. La guérison de ces lésions est favorisée par la réalisation d'un échauffement local continu à 40 °C pendant plusieurs semaines, que celui-ci soit associé ou non à un acte chirurgical d'exérèse. Cet échauffement est le plus souvent réalisé à l'aide de manchons à circulation d'eau chaude adaptés à la zone à traiter.

Certains auteurs ont également pensé que l'oxygénothérapie hyperbare serait efficace sur *M. ulcerans* qui préfère la microaérophilie mais, à ce jour, les résultats obtenus chez l'homme se sont avérés décevants.

8. Prévention, stratégie de lutte et perspectives

Aucun traitement préventif n'est actuellement disponible. Seule la vaccination par le bacille de Calmette et Guérin (BCG) semblerait induire une protection contre l'ulcère de Buruli ou tout du moins permettrait de retarder le délai d'apparition des symptômes. En revanche, l'efficacité de cette vaccination a été démontrée dans la prévention des complications ostéomyélitiques chez les enfants présentant un ulcère de Buruli.

Les mesures préventives sont, quant à elles, liées aux contacts avec le biotope hydrotellurique. Il faut éviter, autant que faire se peut, les contacts avec les eaux stagnantes et marécageuses.

La stratégie de lutte contre l'ulcère de Buruli passe donc par deux voies principales :

– la réalisation de campagnes d'informations afin de permettre un diagnostic plus précoce de l'ulcère de Buruli, à un stade où les traitements antibiotiques peuvent s'avérer encore efficaces ou bien pour assurer la prise en charge de lésions d'étendue limitée pour lesquelles les actes chirurgicaux ne seraient pas trop mutilants ;

– la coordination de la recherche afin de mieux connaître cette maladie et son agent causal et, de ce fait, mieux les prévenir et les combattre. Il reste en effet encore à élucider totalement le mode de transmission de l'ulcère de Buruli et à identifier les vecteurs et réservoirs potentiels de *M. ulcerans* pour tenter d'enrayer la recrudescence de cas d'ulcère de Buruli, notamment en Afrique de l'Ouest, en appliquant des mesures préventives adaptées.

Par ailleurs, et dans une toute autre voie de recherche, le séquençage total du génome de *M. ulcerans* qui est en cours de réalisation devrait fournir un grand nombre d'informations utiles pour lutter contre l'ulcère de Buruli. La recherche de traitements performants non chirurgicaux semble également indispensable.

Points forts

1. Agent infectieux : l'ulcère de Buruli, encore appelé ulcère de Bairnsdale, est causé par une mycobactérie atypique, *Mycobacterium ulcerans*.

2. Importance : l'ulcère de Buruli se situe au troisième rang des infections mycobactériennes chez l'homme derrière la tuberculose et la lèpre. *M. ulcerans* a été reconnu bactérie pathogène émergente par l'OMS en 1998. Dans certaines régions du monde, l'incidence de l'ulcère de Buruli dépasse celle de la tuberculose. Actuellement, l'ulcère de Buruli a été identifié dans une trentaine de pays.

3. Transmission : bien que le rôle des punaises aquatiques comme vecteurs de *M. ulcerans* soit fortement suspecté, le mode de transmission de la maladie n'est pas encore totalement élucidé.
4. Patients : la majorité des patients sont des enfants vivant dans des zones rurales à proximité de rivières ou de marais. L'infection par le VIH n'est pas un facteur de risque d'acquisition de l'ulcère de Buruli.
5. Clinique : l'ulcère de Buruli débute par un nodule, une papule ou un œdème cutané indolore qui peut évoluer vers de vastes ulcérations dont la cicatrisation engendrera des séquelles parfois très invalidantes avec amputations ou perte d'organes. Les membres, particulièrement les membres inférieurs, sont préférentiellement le siège de ces lésions. *M. ulcerans* peut aussi causer des formes osseuses et ostéoarticulaires graves.
6. Pathogénie : le rôle de la mycolactone, exotoxine lipidique, nécrosante, immunosuppressive et cytostatique produite par *M. ulcerans*, est majeur dans la pathogenèse de l'ulcère de Buruli.
7. Diagnostic : le diagnostic est principalement clinique ; le diagnostic bactériologique fait appel aux mêmes techniques que celui des autres mycobactérioses : examen direct après coloration de Ziehl-Neelsen, culture et techniques moléculaires. Ces dernières offrent de nouvelles perspectives pour le diagnostic précoce de l'ulcère de Buruli.
8. Traitement : le traitement antibiotique est inefficace sur les lésions évoluées et le traitement proposé actuellement est purement chirurgical avec excision des lésions et nécessite, dans les cas les plus graves, des hospitalisations de longue durée et très coûteuses. Seuls une détection et un traitement précoces permettent de prévenir l'apparition des complications.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier très sincèrement Anne-Catherine Artigues pour la réalisation de certaines photographies numériques illustrant ce chapitre, ainsi que Karin Janssens pour son aide concernant la rédaction de ce manuscrit.

Pour en savoir plus

La quasi-totalité des références citées ci-après est accessible librement sur Internet.

Le site Internet de l'Organisation mondiale de la santé donne accès à de nombreuses informations et documents sur l'ulcère de Buruli à l'adresse suivante : www.who.int/gtb-buruli/

Des ouvrages variés disponibles en version anglaise, en version française et, pour certains, en version espagnole, ainsi que des outils pédagogiques type bande dessinée peuvent être téléchargés gratuitement à partir de ce site : www.who.int/gtb-buruli/publications/index.html

Ulcère de Buruli – Infection à *Mycobacterium ulcerans* (2000). Edité par Dr Kingsley Asiedu, Dr Robert Scherpbier, Dr Mario Raviglione sous la référence WHO/CDS/CPE/GBUI/2000.1

Diagnostic de l'infection à *Mycobacterium ulcerans* (2001). Edité par Pr Françoise Portaels, A/Pr Paul Johnson, Dr Wayne M. Meyers sous la référence WHO/CDS/CPE/GBUI/2001.4.

Prise en charge de l'infection à *Mycobacterium ulcerans* (2001). Edité par Dr John Buntine, Dr Kimball Crofts sous la référence WHO/CDS/CPE/GBUI/2001.3

De nombreuses publications internationales concernant les différents volets de l'ulcère de Buruli et son agent infectieux, *M. ulcerans*, peuvent également être téléchargés gratuitement sur le site PubMed du National Center for Biotechnology Information à l'adresse suivante : http : //www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi

Bentoucha A, Robert J, Dega H, Lounis N, Jarlier V, Grosset J. Activities of new macrolides and fluoroquinolones against *Mycobacterium ulcerans* infection in mice. Antimicrob Agents Chemother 2001 ; 45 : 3109-12.

Chemlal K, Huys G, Fonteyne PA, Vincent V, Lopez AG, Rigouts L, et al. Evaluation of PCR-restriction profile analysis and IS*2404* restriction fragment length polymorphism and amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification and typing of *Mycobacterium ulcerans* and *M. marinum*. J Clin Microbiol 2001 ; 39 : 3272-8.

Dega H, Robert J, Bonnafous P, Jarlier V, Grosset J. Activities of several antimicrobials against *Mycobacterium ulcerans* infection in mice. Antimicrob Agents Chemother 2000 ; 44 : 2367-72.

Dobos KM, Spotts EA, Marston BJ, Horsburgh CR Jr, King CH. Serologic response to culture filtrate antigens of *Mycobacterium ulcerans* during Buruli ulcer disease. Emerg Infect Dis 2000 ; 6 : 158-64.

George KM, Pascopella L, Welty DM, Small PL. A *Mycobacterium ulcerans* toxin, mycolactone, causes apoptosis in Guinea pig ulcers and tissue culture cells. Infect Immun 2000 ; 68 : 877-83.

Gomez A, Mve-Obiang A, Vray B, Remacle J, Chemlal K, Meyers WM, et al. Biochemical and genetic evidence for phospholipase C activity in *Mycobacterium ulcerans*. Infect Immun 2000 ; 68 : 2995-7.

Gooding TM, Johnson PD, Campbell DE, Hayman JA, Hartland EL, Kemp AS, et al. Immune response to infection with *Mycobacterium ulcerans*. Infect Immun 2001 ; 69 : 1704-7.

Marsollier L, Robert R, Aubry J, Saint Andre JP, Kouakou H, Legras P, et al. Aquatic insects as a vector for *Mycobacterium ulcerans*. Appl Environ Microbiol 2002 ; 68 : 4623-8.

Meyers WM, Shelly WM, Connor DH, Meyers EK. *Mycobacterium ulcerans* infection developing at sites of trauma to skin. Am J Trop Med Hyg 1974 ; 23 : 919-23.

Mve-Obiang A, Lee RE, Portaels F, Small PLC. Heterogeneity of mycolactone toxins produced by *Mycobacterium ulcerans* : implications on virulence. Infect Immun 2003 ; 71 : 774-83.

Palomino JC, Obiang AM, Realini L, Meyers WM, Portaels F. Effect of oxygen on growth of *Mycobacterium ulcerans* in the Bactec system. J Clin Microbiol 1998 ; 36 : 3420-2.

Palomino JC, Portaels F. Effects of decontamination methods and culture conditions on viability of *Mycobacterium ulcerans* in the Bactec system. J Clin Microbiol 1998 ; 36 : 402-8.

Portaels F, Elsen P, Guimaraes-Peres A, Fonteyne PA, Meyers WM. Insects in the transmission of *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer). Lancet 1999 ; 353 : 986.

Portaels F, Chemlal K, Elsen P, Johnson PDR, Hayman JA, Hirkwood R, et al. *Mycobacterium ulcerans* in wild animals. In : Collins MT, Manning B, Eds. Mycobacterial infections in domestic and wild animals. Office International de Epizooties. Scientific and Technical Review Paris 2001 ; 20 : 252-64.

Portaels F, Aguiar J, Debacker M, Steunou C, Zinsou C, Guedenon A, Meyers WM. Prophylactic effect of *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against osteomyelitis in

children with *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli Ulcer). Clin Diagn Lab Immunol 2002 ; 9 : 1389-91.

Ross BC, Johnson PD, Oppedisano F, Marino L, Sievers A, Stinear T, et al. Detection of *Mycobacterium ulcerans* in environmental samples during an outbreak of ulcerative disease. Appl Environ Microbiol 1997 ; 63 : 4135-8.

Ross BC, Marino L, Oppedisano F, Edwards R, Robins-Browne RM, Johnson PD. Development of a PCR assay for rapid diagnosis of *Mycobacterium ulcerans* infection. J Clin Microbiol 1997 ; 35 : 1696-700.

Stinear T, Davies JK, Jenkin GA, Hayman JA, Oppedisano F, Johnson PD. Identification of *Mycobacterium ulcerans* in the environment from regions in Southeast Australia in which it is endemic with sequence capture-PCR. Appl Environ Microbiol 2000 ; 66 : 3206-13.

Stinear TP, Jenkin GA, Johnson PD, Davies JK. Comparative genetic analysis of *Mycobacterium ulcerans* and *Mycobacterium marinum* reveals evidence of recent divergence. J Bacteriol 2000 ; 182 : 6322-30.

Stinear T, Ross BC, Davies JK, Marino L, Robins-Browne RM, Oppedisano F, et al. Identification and characterization of IS*2404* and IS*2606* : two distinct repeated sequences for detection of *Mycobacterium ulcerans* by PCR. J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 1018-23.

Stinear TP, Mve-Obiang A, Small PL, Frigui W, Pryor MJ, Brosch R, et al. From the cover : giant plasmid-encoded polyketide synthases produce the macrolide toxin of *Mycobacterium ulcerans*. Proc Natl Acad Sci USA 2004 ; 101 : 1345-9.

Mycobacterium tuberculosis et mycobactéries atypiques

Chapitre 7

Bactériologie fondamentale : aspects récents

Véronique Vincent, Christian Martin, François Denis

Dans ce chapitre de bactériologie fondamentale, seuls les aspects spécifiques du genre seront abordés. Les revues récentes sur le génome et la structure des mycobactéries et les sites Internet concernant les résultats ou projets de recherche permettront d'approfondir certains domaines en particulier.

Le séquençage du génome de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, de *Mycobacterium leprae* a permis d'initier de nombreuses études dans la connaissance des mycobactéries, que ce soit d'un point de vue génétique (phylogénie), d'un point de vue structural (enzymes des voies de synthèse des composés pariétaux) ou métabolique. Ces recherches fondamentales ont des retombées dans le domaine clinique comme la détermination des mécanismes d'action des antituberculeux et la détection de nouvelles molécules antimycobactériennes.

La première partie de ce chapitre sera consacrée aux aspects taxonomiques et génétiques des mycobactéries intégrant les données récentes du séquençage de *Mycobacterium tuberculosis* et de *Mycobacterium leprae*. Le second volet consistera en un aperçu de la complexité de la paroi des mycobactéries et de sa richesse en lipides et du rôle de ces structures dans la physiopathologie. Enfin, les aspects plus spécifiques du métabolisme (fer, lipides) des mycobactéries seront abordés.

1. Taxonomie : généralités

Le genre *Mycobacterium* est le seul genre de la famille des *Mycobacteriaceae* dans l'ordre des Actinomycétales. Les genres les plus proches comprennent *Corynebacterium, Nocardia, Rhodococcus, Dietzia, Skermania, Gordonia*, et *Tsukamurella*.

Selon la définition classique du genre *Mycobacterium*, reposant sur les propriétés morphologiques et tinctoriales, les mycobactéries se présentent comme des bacilles droits ou légèrement incurvés, immobiles, ne formant ni spore ni capsule. Certaines mycobactéries apparaissent comme coccobacillaires, filamenteuses ou en mycélium. De nombreuses espèces produisent des pigments de type caroténoïdes, conférant aux colonies une couleur jaune à orange foncé, après photo-induction ou en absence de toute exposition à la lumière. La composition particulière de la paroi mycobactérienne ne permet pas de coloration par la méthode de Gram, mais nécessite des techniques de coloration spécialement développées, dérivées de la méthode originale de Ziehl-Neelsen. Les bacilles colorés avec de la fuchsine basique résistent à la décoloration par traitement conjuguant l'action d'acide et d'alcool. L'acido-résistance de la coloration des bacilles constitue un des tests-clés de la détection des mycobactéries.

La définition actuelle du genre *Mycobacterium* repose sur trois critères : l'acido-alcoolo-résistance des bacilles, la présence d'acides mycoliques à structure particulière et la valeur du contenu en guanine-cytosine (GC %) de l'ADN. La propriété d'acido-alcoolo-résistance est liée à la présence des acides mycoliques mycobactériens. Cependant, les acides mycoliques per se ne sont pas spécifiques aux mycobactéries. Les familles proches des *Mycobacteriaceae* (mentionnées plus haut) synthétisent également ces acides gras α-ramifiés β-hydroxylés. De même, ces familles bactériennes présentent un pourcentage

en GC proche de celui des mycobactéries, de l'ordre de 60 à 70 %. La caractéristique qui fonde véritablement le genre *Mycobacterium* est la structure fine des acides mycoliques. Les acides mycoliques mycobactériens se singularisent par leur haut poids moléculaire, de 60 à 90 atomes de carbone, et la production d'esters de pyrolyse de 22 à 26 atomes de carbone. De plus, les mycobactéries sont les seuls organismes à synthétiser des acides mycoliques porteurs de fonctions oxygénées supplémentaires, telles que méthoxy, cétone, époxyde ou carboxylique. La mise en évidence de ces caractéristiques structurales peut être effectuée par chromatographie en couche mince, gazeuse ou liquide à haute pression.

Les espèces mycobactériennes se séparent en deux groupes selon leur taux de croissance. Les espèces dites à croissance lente développent des colonies en plus de sept jours sur milieu solide alors que celles dites à croissance rapide développent des colonies en moins de sept jours. Les différences de taux de croissance sont corrélées à des différences d'exigence métabolique. Les mycobactéries à croissance lente ne se développent que sur milieux de culture particuliers tels le milieu de Löwenstein-Jensen alors que les espèces à croissance rapide sont capables de cultiver sur gélose nutritive ou peptonée. Ces différences phénotypiques sont corrélées au nombre de copies du gène codant l'ARNr 16S. Généralement, les espèces à croissance lente possèdent une seule copie du gène alors que celles à croissance rapide en possèdent deux. Des différences structurales de l'ARNr 16S sont également retrouvées selon le taux de croissance des espèces. Les espèces à croissance lente présentent un branchement majeur en hélice (au niveau des nucléotides 451-482 dans la numérotation de l'ARNr 16S chez *E. coli*), absent chez les mycobactéries à croissance rapide.

L'espèce type est *Mycobacterium tuberculosis*, avec H37Rv comme souche type. Aujourd'hui, plus de 90 espèces mycobactériennes ont été décrites, parmi lesquelles des pathogènes majeurs (bacilles de la tuberculose et de la lèpre), mais aussi des pathogènes opportunistes et de nombreuses espèces commensales ou saprophytes. Des arbres phylogénétiques du genre *Mycobacterium* ont été construits pour définir l'évolution et la proximité génétique entre les espèces mycobactériennes (Fig. 7.1A et 7.1B). La division phénotypique majeure entre espèces à croissance rapide et espèces à croissance lente apparaît comme un embranchement majeur dans les arbres. En d'autres termes, les espèces à croissance rapide se regroupent dans une même partie des arbres tandis que celles à croissance lente se regroupent dans une autre partie. Le gène de l'ARNr 16S (Fig. 7.1A) est l'une des cibles moléculaires les plus largement utilisées pour l'identification des espèces. La séquence complète du gène a été étudiée de façon exhaustive et révèle deux régions hypervariables A et B. Ces régions peuvent être considérées comme des séquences signatures des espèces mycobactériennes. Cependant, l'horloge moléculaire du gène codant l'ARNs 16S est parfois trop conservée et des espèces distinctes peuvent présenter des séquences du gène absolument identiques. C'est le cas par exemple pour *M. kansasii* et *M. gastri*, *M. marinum* et *M. ulcerans*, *M. chelonae* et *M. abscessus*. D'autres gènes conservés sont utilisés comme cibles alternatives pour identifier les espèces mycobactériennes grâce à un polymorphisme plus élevé que celui du gène de l'ARNr 16S. Il s'agit du gène *hsp65* codant la protéine de choc thermique 65 kDa (Fig. 7.1B),

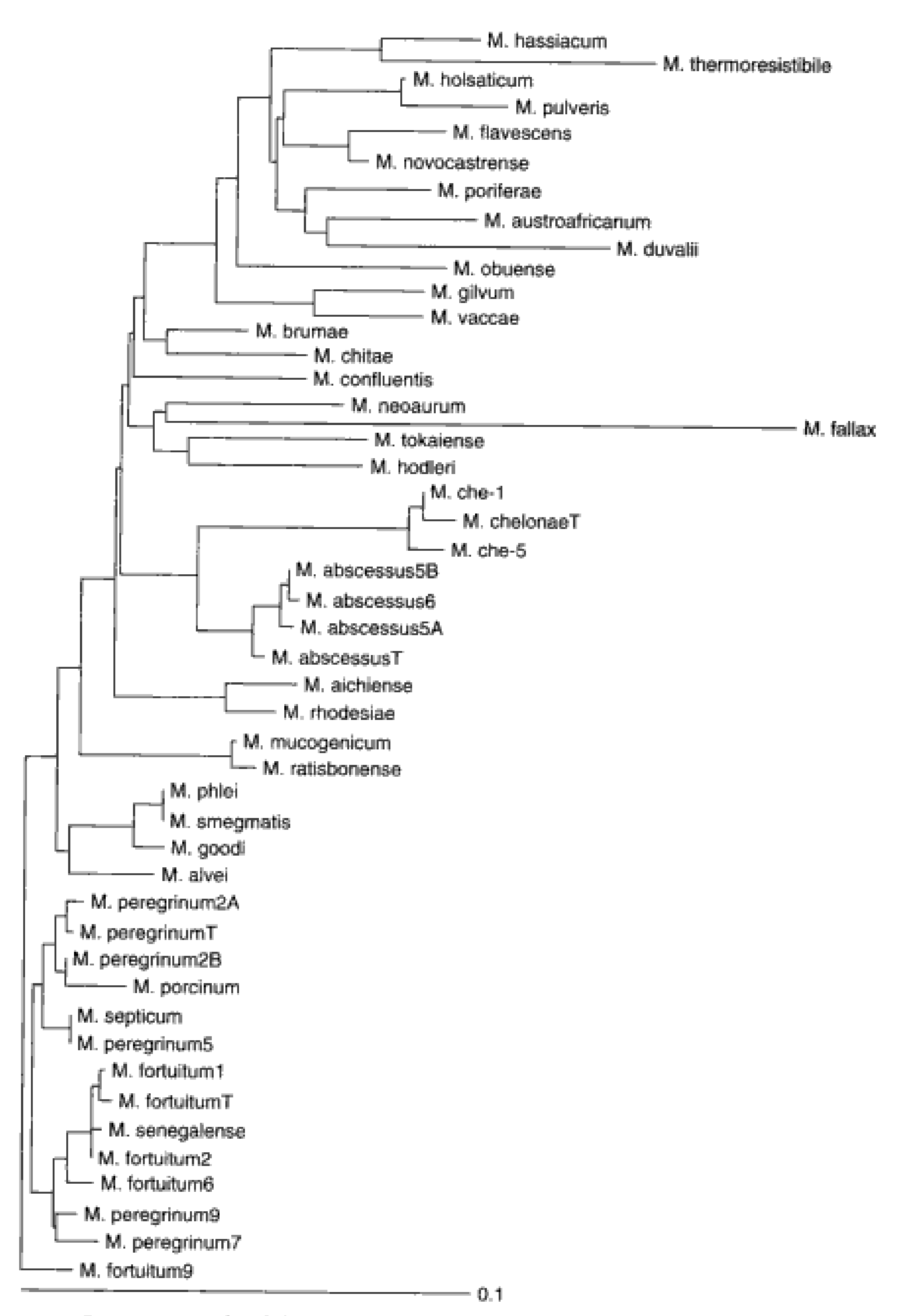


Figure 7.1. A. Arbre phylogénétique obtenu après séquençage du gène codant l'ARN 16S.

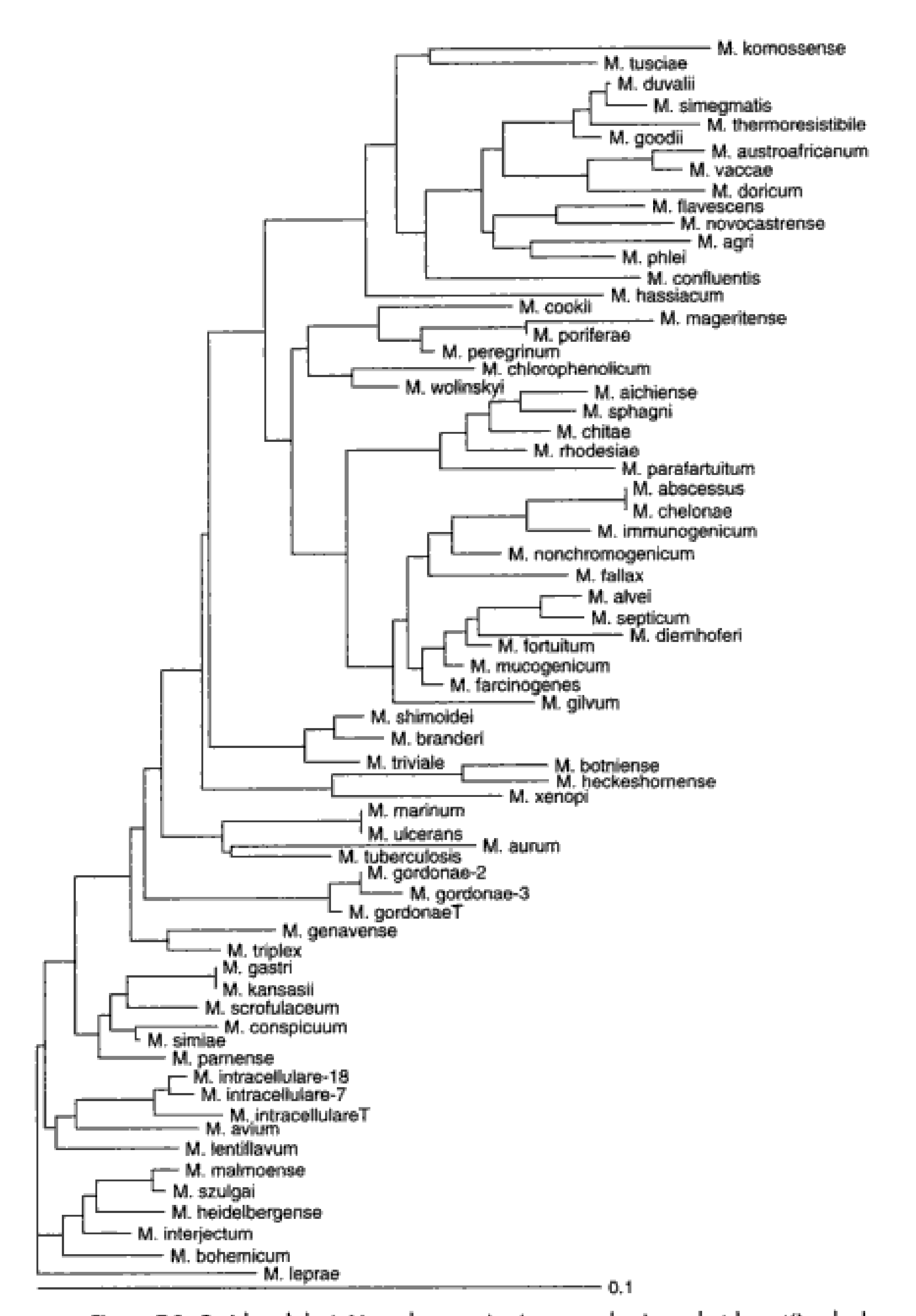


Figure 7.1. B. Arbre phylogénétique obtenu après séquençage du gène codant la protéine de choc thermique 65 kDa.

le gène *rpo*B codant l'ARN polymérase, le gène *gyr*B codant une gyrase et cible de l'action des quinolones, le gène *sod*A codant la superoxide dismutase et la région intergénique 16S-23S. À l'inverse de ce qui est observé pour le gène codant l'ARNr 16S, les autres gènes peuvent présenter plusieurs allèles pour une même espèce. Des tests commercialisés utilisent le polymorphisme de certains de ces gènes pour l'identification d'espèces mycobactériennes. La technique dite MLST (*multi-locus sequence typing*) ne s'intéresse pas au polymorphisme d'un gène unique comme les techniques précédentes mais analyse simultanément les séquences de plusieurs gènes discriminants. L'identification de combinaisons alléliques uniques correspond à l'identification des différentes espèces mycobactériennes. Plus l'analyse de loci s'élève, plus le niveau de discrimination augmente. La technique comportant le séquençage de sept loci a été récemment appliquée avec succès à *M. marinum* et *M. ulcerans*, alors que l'analyse de cibles moléculaires indépendantes ne permettait pas de discriminer entre ces deux espèces phylogénétiquement très proches.

2. Génome

Le séquençage complet de *M. tuberculosis* H37Rv et de plusieurs autres souches apporte une masse d'informations considérables sur l'organisation et l'évolution du génome mycobactérien.

2.1. Génome des mycobactéries de la tuberculose

2.1.1. Génome de *Mycobacterium tuberculosis*

Le génome de *M. tuberculosis* H37Rv comprend plus de 4,4 millions de paires de bases et correspond à environ 4 000 gènes codant des protéines et 50 gènes codant de l'ARN (Fig. 7.2). La capacité codante du génome (91 %) et la densité de gènes (1 gène pour 1,1 kb) sont similaires à celle des autres procaryotes. Le pourcentage en GC est de 65,6 % en moyenne, mais le génome présente des régions beaucoup plus riches en GC, notamment deux grandes familles de gènes dits PE et PPE. Les gènes sont à peu près équitablement distribués sur les deux brins de l'ADN. Chez *M. tuberculosis*, 59 % des gènes sont transcrits avec la même polarité que la fourche de réplication, alors que ce pourcentage s'élève à près de 75 % chez *B. subtilis*. Il est généralement admis que le taux d'expression des gènes est plus élevé lorsque transcription et réplication agissent avec la même polarité. Ainsi, la distribution uniforme des gènes sur les deux brins d'ADN peut contribuer à expliquer le temps de génération élevé (environ 24 h) de *M. tuberculosis*. De plus, le génome de *M. tuberculosis* ne révèle qu'une seule copie de l'opéron d'ARN ribosomal, situé à 1 500 kb de l'origine de réplication. Cette disposition contribue également à expliquer la lenteur de croissance de *M. tuberculosis* car la plupart des autres bactéries présentent plusieurs opérons d'ARN ribosomal, situés à proximité de l'origine pour bénéficier de la duplication des gènes pendant la réplication.
Cinquante-huit pour cent des gènes codent des protéines à fonctions connues, 27 % pour des fonctions putatives et 15 % pour des protéines à fonction

Figure 7.2. Représentation schématique du génome de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

inconnue qui pourraient correspondre à des protéines spécifiques des mycobactéries. Environ 9 % du génome code les protéines des familles PE (motif Pro-Glu) et PPE (motif Pro-Pro-Glu), dont la structure répétitive représente une source probable de variation antigénique. Plus de 50 % des gènes résultent de duplication de gènes, soit un niveau comparable à celui d'autres génomes procaryotes de même taille. Cependant, chez *M. tuberculosis,* le degré de similarité entre les copies est très élevé, suggérant que les événements de duplication sont récents.

Le génome de *M. tuberculosis* est caractérisé par l'abondance de gènes codant des enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides. Il en a été identifié 250 alors que *E. coli* par exemple en compte seulement 50. On retrouve tous les gènes du métabolisme aérobie mais aussi les chaînes anaérobies de transport des électrons. L'existence de ces gènes confirme la capacité d'adaptation de *M. tuberculosis* aux changements d'environnement comme la faible tension en oxygène prévalant dans le granulome ou les tissus pauvres en oxygène.

De plus, *M. tuberculosis* est très riche en éléments répétés, soit des séquences d'insertion (IS), soit des répétitions en tandem insérées dans les régions intercistroniques de gènes d'un même opéron (*mycobacterial insertion repetitive units,* MIRU). Chez H37Rv, on dénombre 56 IS appartenant à huit familles. Certaines de ces IS présentent des similarités élevées avec d'autres actinomycètes comme *Rhodococcus* ou *Nocardia,* suggérant la possibilité de transfert

horizontal, vestige probable de l'époque où l'organisme ancêtre des bacilles de la tuberculose était un saprophyte du sol partageant la même niche écologique que d'autres germes. Les IS peuvent être à l'origine de réarrangements chromosomiques et de délétions. L'étude de collection de souches de *M. tuberculosis* montre que la plupart des IS sont présentes en une ou deux copies et se retrouvent aux mêmes loci, suggérant que ces éléments sont inactifs ou confèrent une immunité de transposition empêchant l'accumulation d'insertions. IS*6110* représente une exception notable avec une grande variété en nombre de copies et un polymorphisme élevé de position dans le génome. La génomique comparative a permis d'identifier des régions délétées par recombinaison entre éléments IS*6110*, indiquant le rôle d'IS*6110* dans les réarrangements génomiques. Les MIRU, identifiées dans 41 loci chez H37Rv, présentent un polymorphisme de répétition dans la plupart des loci et peuvent être utilisés comme outils de typage de *M. tuberculosis*. Deux prophages ont été détectés chez H37Rv et l'analyse d'un grand nombre de souches a montré leur stabilité dans le génome de *M. tuberculosis*.

L'analyse des séquences de 26 gènes chez 800 souches de *M. tuberculosis* de différentes régions géographiques montre un très faible polymorphisme génétique. Ainsi, le niveau de variation allélique de *M. tuberculosis* est 2 000 fois plus faible que chez *Borrelia burgdorferi* et 600 fois plus faible que chez *Neisseria meningitidis*. Le polymorphisme des gènes *katG*, codant une catalase-peroxydase, et *gyrA*, codant la sous-unité A de la gyrase, identifie trois groupes génétiques. L'un de ces groupes rassemble des représentants de tous les membres du complexe des bacilles de la tuberculose, à savoir *M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum* et *M. microti* alors que les deux autres groupes n'incluent que *M. tuberculosis* stricto sensu.

L'ensemble des observations montre que *M. tuberculosis* présente une structure de population extrêmement clonale, que la plasticité du génome est principalement due à des réarrangements liés à des séquences d'insertion plus qu'à des mutations ponctuelles, et *M. tuberculosis* est un organisme jeune en termes d'évolution. Les sites des données des programmes de séquences sont http://genolist.pasteur.fr/TubercuList pour *M. tuberculosis* H37Rv et http://www.tigr.org/tdb/CMR/gmt/htmls/SplashPage.html pour *M. tuberculosis* CDC1551.

2.1.2. Génomique comparative

L'hybridation ADN/ADN a montré que l'ensemble des bacilles de la tuberculose (*M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum, M. microti*) appartenaient à une seule et même espèce génomique. Cependant, les différents membres peuvent être individualisés par tests phénotypiques ainsi que par leur spectre d'hôte et leur virulence. La comparaison des génomes de *M. bovis* et *M. tuberculosis* a permis d'identifier des régions de différence qui correspondent principalement à des fonctions métaboliques et des facteurs de virulence putatifs. La distribution de ces régions constitue ainsi un outil génétique intéressant pour l'identification des espèces. Les régions de différence correspondent à des séquences délétées soit chez *M. bovis*, soit chez *M. tuberculosis*, ce qui indique que la perte de matériel génétique affecte les deux membres du complexe et que *M. tuberculosis* ne peut avoir évolué de *M. bovis*. L'hypothèse de *M. bovis* comme organisme ancestral repose sur l'idée que l'homme aurait été en contact avec

la tuberculose lors de la domestication du bétail et que *M. bovis* aurait restreint son hôte à l'homme en évoluant vers *M. tuberculosis*. L'hypothèse la plus probable est que les deux bacilles dérivent d'un ancêtre commun. La découverte d'ADN plus proche de l'ADN des bacilles humains actuels (*M. tuberculosis* ou *M. africanum*) que de *M. bovis* chez un bison d'Amérique du Nord de 15 000 ans avant notre ère renforce cette hypothèse. Cette découverte indique également que l'arrivée des bisons par le détroit de Béring, reliant alors les continents, aurait importé la tuberculose en Amérique, il y a près de 20 000 ans. La comparaison des génomes de souches de différents membres du complexe des bacilles de la tuberculose a permis d'identifier des régions de différence spécifiques d'espèce qui assurent une identification fiable de chaque membre du complexe.
L'adresse du site web du programme de séquençage de *M. bovis* est http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_*bovis*.

2.2. Génome de *Mycobacterium leprae*

M. leprae n'est toujours pas cultivable in vitro et présente un temps de génération particulièrement long, estimé à 14 jours dans le modèle expérimental murin. La séquence complète du génome montre un génome de 3,27 Mb, plus petit que *M. tuberculosis* (4,41 Mb). Le contenu en GC est beaucoup plus faible que celui de M. *tuberculosis* (57,8 % pour *M. leprae* et 65,6 % pour *M. tuberculosis*). Ces deux caractéristiques sont dues en partie à la perte de nombreuses copies de gènes des familles PE et PPE. En effet, *M. leprae* présente seulement neuf copies de ces gènes très riches en pourcentage de GC alors que *M. tuberculosis* en possède plus de 160 copies. Les délétions génomiques incluent des gènes impliqués dans d'importantes activités métaboliques (production de sidérophores, l'essentiel des chaînes respiratoires anaérobies et micro-aérophiles, nombreux systèmes cataboliques...). La comparaison des génomes montre des structures en mosaïque, avec des régions où l'organisation des gènes est conservée mais où sont parsemées différentes régions flanquantes. Des recombinaisons extensives entre éléments répétitifs dispersés pourraient expliquer cette évolution. L'analyse du protéome révèle une évolution extrêmement réductrice. Seulement 391 protéines solubles sont détectées (à comparer aux 1 800 de *M. tuberculosis*) au lieu des 3 000 protéines attendues si tous les gènes étaient actifs. L'analyse des génomes de souches de *M. leprae* isolées dans des régions géographiques variées montre une forte conservation à l'intérieur de l'espèce. La présence de MIRU a été détectée sans que le polymorphisme de ces éléments ait été déterminé pour différentes souches de *M. leprae*. Le site web pour le génome de *M. leprae* est http://genolist.pasteur.fr/leproma.

2.3. Génomes des autres mycobactéries

Des éléments répétés sont également présents chez les autres espèces mycobactériennes. On retrouve chez d'autres espèces des copies multiples des gènes des familles de protéines PE et PPE aussi appelées PGRS (*polymorphic GC repetitive sequences*) et MPTR (*major polymorphic tandem repeats*). Alors que la distribution des gènes MPTR (codant les protéines PPE) est très conservée

pour l'ensemble des souches de *M. tuberculosis*, on retrouve un polymorphisme de distribution chez *M. kansasii* et *M. gordonae* autorisant ces marqueurs comme outils de typage moléculaire. Chez *M. kansasii*, ces éléments permettent de séparer les souches en cinq groupes correspondant à des sous-espèces. L'identification des sous-espèces est corrélée à d'autres marqueurs en particulier à la présence de la séquence d'insertion IS*1652* présente chez seulement deux des cinq sous-espèces. Les séquences PGRS (codant les protéines PE) se retrouvent également chez *M. gordonae, M. kansasii, M. gastri*, mais aussi chez *M. marinum* et *M. szulgai*.

Des séquences d'insertion ont également été identifiées chez plusieurs espèces mycobactériennes (Tableau 7.1). Il s'agit essentiellement de séquences des familles IS*3* (comme IS*6110*), IS*110* et IS*256*. Cette classification repose sur les similarités des transposases et sur l'organisation générale de l'élément. La plupart des séquences d'insertion ont un spectre d'hôte très restreint et sont donc largement utilisées comme cibles d'amplification pour une identification spécifique. La possibilité d'utiliser ces éléments comme outils de typage moléculaire dépend essentiellement de leur polymorphisme de distribution. Bien que présente de 15 à 20 copies chez *M. paratuberculosis*, IS*900* ne présente pas un polymorphisme de distribution suffisant pour constituer un outil de typage intéressant, alors que IS*1245* et IS*1311* révèlent un pouvoir de discrimination élevé chez *M. avium*.

2.4. Plasmides circulaires et linéaires

Contrairement aux bacilles de la tuberculose et de la lèpre qui ne contiennent aucun plasmide, de nombreuses espèces mycobactériennes hébergent des

Tableau 7.1
Séquences d'insertion dans les différentes espèces mycobactériennes

Nom	Espèce	Typage
IS*900* (famille IS*110*)	*M. avium* subsp. *paratuberculosis*	–
IS*901* (famille IS*110*)	*M. avium* subsp. *silvaticum*	–
IS*1245*/IS*1311* (famille IS*256*)	*M. avium*	+
IS*1141* (famille IS*3*)	*M. intracellulare*	–
IS*2606* (famille *IS256*)	*M. ulcerans*	+
IS*2404* (famille ISAs*1*)	*M. ulcerans*	+
IS*1652* (famille *IS256*)	*M. kansasii*	–
IS*1395* (famille IS*256*)	*M. xenopi*	+
IS*1511*/*1512* (famille IS*256*)	*M. gordonae*	+
IS*1408* (famille IS*256*)	*M. branderi*	–
IS*1407* (famille IS*256*)	*M. celatum*	–

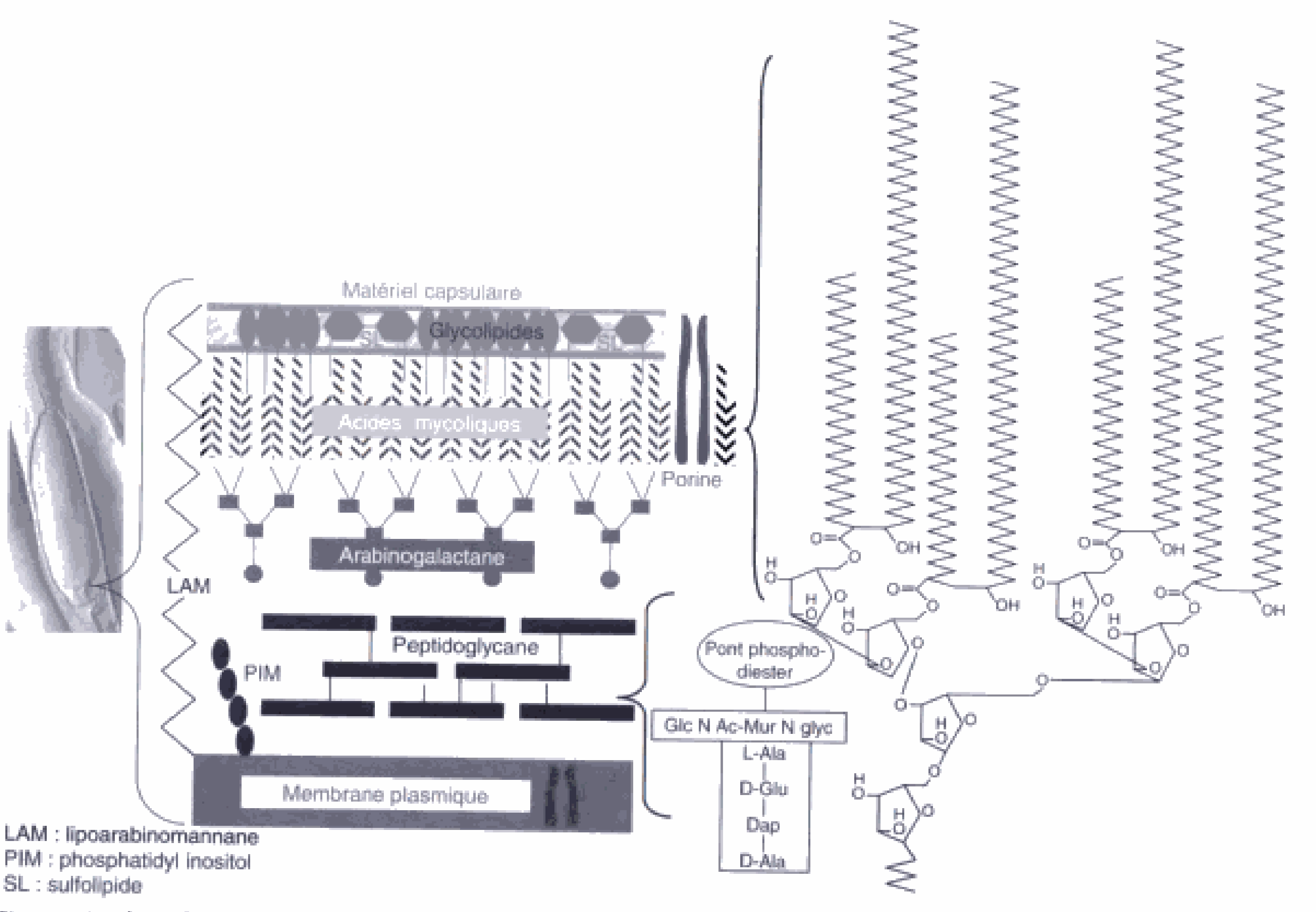
éléments extrachromosomiques. Les premiers plasmides mycobactériens ont été découverts en 1979 chez *M. avium*. D'autres plasmides circulaires ont par la suite été décrits chez les espèces phénotypiquement proches, *M. intracellulare* et *M. scrofulaceum*, puis chez des espèces à croissance rapide comme *M. chelonae, M. abscessus, M. fortuitum* et *M. smegmatis*. Il s'agit soit de plasmides de petite taille, de 5 à 30 kb, soit de plasmides de taille supérieure à 100 kb. La prévalence des plasmides dans les souches d'une même espèce varie d'une espèce à l'autre. pAL5000, le plus petit des plasmides identifiés, a été entièrement séquencé et a été à l'origine des premiers plasmides navettes, permettant l'essor de la génétique mycobactérienne actuelle. Des plasmides navettes *E. coli*/mycobactéries ont été construits à partir de pAL5000 et différents réplicons de *E. coli* et largement utilisés pour le transfert d'ADN chez les mycobactéries.

Des plasmides linéaires ont été décrits à partir de 1997 dans différentes espèces dont *M. xenopi, M. celatum, M. branderi, M. avium* et *M. fortuitum*. Ces plasmides de taille hétérogène, de 20 à 320 kb, présentent tous une structure en invertrons, avec des protéines liées de façon covalente aux extrémités. Ces plasmides présentent des hybridations croisées, suggérant la possibilité de transferts interespèces ou une origine commune. L'étude de l'origine de réplication d'un plasmide linéaire de 23 kb, pCLP, hébergé par *M. celatum* a montré une identité de séquence avec l'origine de réplication de plasmides mycobactériens circulaires. De plus, des loci similaires à des gènes de plasmides circulaires impliqués dans la partition et les mécanismes postségrégationnels ont également été identifiés chez ce plasmide linéaire. L'ensemble de ces résultats souligne l'interrelation entre plasmides linéaires et circulaires chez les mycobactéries. Le séquençage complet de pCLP a montré des gènes similaires avec le chromosome de *M. tuberculosis*, en particulier des séquences liées à des transposases. Ce résultat suggère un transfert horizontal entre les deux espèces, peut-être vestige de l'époque où les organismes ancêtres de *M. tuberculosis* et de *M. celatum* partageaient la même niche écologique.

Le séquençage du plasmide circulaire pAL5000 n'a pas permis d'identifier les fonctions des gènes plasmidiques autres que celles liées à sa propre réplication. Pour les autres plasmides, peu de phénotypes associés ont pu être élucidés. Certains plasmides sont responsables de résistance aux métaux lourds (mercure, cuivre), d'autres de la dégradation des molécules complexes telles la morpholine ou le phénanthrène.

3. Structure pariétale

Les mycobactéries sont classées parmi les bactéries à Gram positif. Cependant, elles présentent certaines similitudes, notamment au niveau de la paroi, avec les bactéries à Gram négatif. L'enveloppe des mycobactéries est constituée d'une membrane plasmique, d'une paroi et d'une capsule (Fig. 7.3). La paroi est composée d'un complexe de trois structures (peptidoglycane, arabinogalactane et acides mycoliques) liées de façon covalente (Tableau 7.2). La capsule est constituée de chaînes glycaniques, de peptides, de protéines et de lipides (Tableau 7.2).



LAM : lipoarabinomannane
PIM : phosphatidyl inositol
SL : sulfolipide

Figure 7.3. Schéma de l'enveloppe. Le lipoarabinomannane et le phosphatidyl inositol sont ancrés au niveau de la membrane plasmique.

3.1. Membrane plasmique

3.1.1. Structure

La membrane plasmique des mycobactéries ne diffère pas de celles des autres bactéries ; une bicouche lipidique contenant des lipides polaires, des phospholipides associés à des protéines.
Les lipides polaires contiennent des acides gras à courtes chaînes (20 atomes de C). Les principaux phospholipides présents au niveau de la membrane sont le phosphatidylinositol mannoside (PIM), le phosphatidylinositol, et le phosphatidyléthanolaamine.
Daffé et Draper ont décrit un autre composant, sans certitude sur sa localisation membranaire, le lipoarabinomannane (LAM), constitué d'un groupement phosphatidyl inositol lié à l'arabinomannane qui serait ancré au niveau de la membrane. Cette molécule lierait la membrane à la paroi ou formerait un pont « enjambant » la paroi. La structure de base (arabinomannane) commune est composée d'une quinzaine d'unités D-mannose (1→6) sous forme pyranose (*p*) sur lesquelles sont greffées de courtes chaînes latérales (D-mannose 1→2 *p*) et des chaînes plus longues (polymères de D-arabinose 1→5 *p*) terminées soit par un résidu mannopyranosyl, soit par un résidu arabinofuranosyl. Ces derniers sont les déterminants antigéniques des arabinomannanes. Ces arabinomannanes sont phosphorylés et acylés par des acides palmitiques et stéariques chez les mycobactéries du groupe de la tuberculose.

3.1.2. Fonctions

Le lipoarabinomannane interviendrait dans l'activation macrophagique et dans la résistance aux composés oxygénés produits par les macrophages (voir chapitre Physiopathologie de la tuberculose).

3.2. Paroi

3.2.1. Structure

3.2.1.1. Peptidoglycane

Le peptidoglycane des mycobactéries possède une structure analogue aux autres bactéries et confère rigidité et forme aux bacilles. Il est composé d'unités alternées de N-acétyl-β-glucosamine et d'acide N glycolyl-β-D muramique liés en 1→4. Des ponts tétrapeptides (L-alanyl-D–isoglutaminyl-meso-diaminopimelyl-D-alanine) liés à l'acide muramique composent un réseau conférant sa rigidité au peptidoglycane par des liaisons Dap-D-Ala et Dap-Dap.

3.2.1.2. Arabinogalactane

L'arabinogalactane, composé pariétal majeur (35 % de son poids sec), est constitué d'un polymère de D-arabinose et de D-galactose sous forme furanose (*f*). D'après Daffé, la structure de l'arabinogalactane est divisée en deux domaines : un domaine galactane d'une succession alternée d'une trentaine de résidus 5- et 6-β-DGal fixés à l'acide muramique par un pont

Tableau 7.2
Caractéristiques structurales et fonctions des différents composants de la capsule et de la paroi des mycobactéries

Composantes	Structure	Fonctions
	Capsule	
	Polysaccharides	
Glucane (100 kDa)	Chaînes de glucopyranosyl unies par des liaisons 1–4 comprenant des ramifications de glucose qui se fixent en position 6 de la chaîne principale Structure comparable au glycogène cytosolique mais de masse moléculaire très inférieure	
Arabinomannane (AM, 13 kDa)	Chaîne de mannopyranosyl (D-mannose → 6) comprenant des ramifications de D-arabinane de structure analogue à celle décrite au niveau du LAM de la paroi	
	Protéines	
– Sécrétées 24 kDa 45–47 kDa		
– Lipoprotéines résidentes 19 kDa 38 kDa 3–31 kDa en « Ag 85 » 29 kda 23 kda 40 kDa 29 kDa 27 kDa	Lipoprotéine glycosylée Lipoprotéine glycosylée fixant les phosphates Lipoprotéine fixant la fibronectine Récepteur de sidérophore (exocheline) 207 AA. Superoxyde dismutase (SOD) Mn-dépendante L-Ala-déshydrogénase β-lactamase Adhésine	Rôle dans la virulence des MTB Immunogène Implication dans l'inhibition de la phagocytose par les cellules hôtes Rôle dans la croissance de mycobactéries en milieu carencé en fer Protection contre la phagocytose ? (*M. avium*) Rôle dans la synthèse du peptidoglycane (*M. tuberculosis*, *M. marinum*) Hydrolyse des β-lactamines (*M. fortuitum*) Adhérence (*M. tuberculosis*)
	Lipides	
Glycolipides phénoliques (PGL)	Core lipidique lié à une protéine glycanique par un noyau phénol La spécificité d'espèce est portée par le disaccharide terminal	PGL-1 de *M. leprae* : rôle dans la diminution de la réponse oxydative des macrophages Neutralisation des radicaux superoxydes Inhibition non spécifique de la réponse lymphoproliférative

Tableau 7.2 *(suite)*

Capsule		
Composantes	Structure	Fonctions
Glycopeptidolipides (GPL)	À mycoside C Chaîne d'acide gras liée à un tripeptide (Phe-Thr-Ala) qui est terminé par un résidu alaninol. Les sucres sont fixés sur ce dernier ou au niveau du résidu Thr À sérine Chaîne d'acide gras liée à un tétrapeptide (L-Ser) - L-Phe - D-Thv. La chaîne glycanique est greffée au niveau du résidu Thr mais porte un acide gras en C12	MAC et mycobactéries à croissance rapide Récepteur de phage Changement dans l'expression de récepteurs cellulaires *M. xenopi*
Acylthéhaloses	Dimycoloyl trehalose ou *cord factor* 6,6' dimycolate d'α, α'-D tréhalose (TDM) Sulfatides 2, 3, 6, 6' tetraacyl α, α'tréhalose-2'-sulfate	Toxicité mitochondriale, inhibition de la respiration et de la phosphorylation Activité granulomateuse et antitumorale

Paroi cellulaire		
Composant	Structure	Fonctions
Peptidoglycane	Chaîne de dimères de N-acetyl glucosamine liée à l'acide muramique lié en β1 → 4 Un tétrapeptide lié à l'acide muramique crée un réseau entre ces chaînes	Toutes les espèces
Arabinogalactane	D-arabino furanosyl-D galactofuranosyl Les chaînes galactanes fixées sur le peptidoglycane (pont phosphodiester) sont substituées par 3 chaînes arabinane chacune. Deux tiers de ces chaînes sont estérifiés par des acides mycoliques	Toutes les espèces Inhibition de la synthèse par l'éthambutol. Inhibition de la prolifération des cellules T induites par les Ag
Acides mycoliques Lipides exclusifs de la paroi	Longue chaîne d'acide gras α-ramifiés β-hydroxylés Différentes spécificités d'acides mycoliques à l'intérieur d'une même espèce I acide α mycolique II acide α mycolique III acide methoxy mycolique IV acide keto mycolique V acide époxy mycolique VI acide carboxy mycolique VII acide (ω_1) méthoxy mycolique	Toutes les espèces

phosphodi-ester et un domaine arabinane constitué de deux types de chaînes greffées sur le domaine galactane aux niveaux de résidus 5,6 β-gal.

3.2.1.3. Acides mycoliques

Les acides mycoliques sont des acides gras α-ramifiés et β-hydroxylés rencontrés dans la paroi de bactéries à Gram positif de nombreux genres (*Corynebacterium, Nocardia, Rhodococcus*...). Les acides mycoliques présents chez les mycobactéries sont constitués d'une chaîne de 60 à 90 atomes de carbone reliés par des ponts méthyléniques ; ils sont plus longs que ceux rencontrés chez les autres genres. Les différents groupements chimiques (éthylénique, méthoxyle, carbonyle...) portés par la chaîne principale sont à la base de la classification des acides mycoliques. Une classification en six groupes est utilisée dans l'identification de ce genre : après extraction et méthylation, les extraits d'acides mycoliques après migration en chromatographie couche mince sur gel de silice des extraits sont révélés par une solution de rhodamine. Les acides mycoliques sont synthétisés au niveau du cytoplasme et sont transportés par le mycoyl-acyltréhalose vers le peptidoglycane puis vers le dimycolate de tréhalose (TDM) et l'arabinogalactane. Les acides mycoliques sont une des cibles de l'isoniazide (antituberculeux majeur).

3.2.2. Propriétés – Fonctions

Les activités biologiques des différents composants de la paroi ne sont pas toutes bien définies et éprouvées. Par exemple, le rôle d'adjuvant du dimuramyl peptide est contesté. En revanche, la persistance de résidus de la paroi dans des tissus aurait une contribution importante dans la physiopathologie. Les acides mycoliques protégeraient le peptidoglycane et l'arabinogalactane de l'activité lytique des enzymes.

3.3. Capsule

La mise en évidence d'une capsule chez les mycobactéries de manière indirecte (présence d'un halo) remonte à la fin des années 1950. Depuis, de nombreuses études ont permis de préciser la composition de cette capsule. La capsule de *M. tuberculosis* est composée de polysaccharides (30–55 %), de protéines (40–55 %) et de lipides (3–8 %).

3.3.1. Polysaccharides

Les principaux composants de la capsule sont un glycane et un hétéropolysaccharide : l'arabinomannane. Le glycane possède une structure analogue au glycogène cytosolique d'une masse moléculaire plus faible (1 000 fois) et présentant des chaînes branchées moins longues et l'arabinomannane. L'arabinomannane (D-arabino-D-mannane) est une plus petite molécule de 13 kDa.

Les propriétés biologiques de ces polysaccharides ne sont pas précisément connues, mais ils joueraient un rôle de barrière vis-à-vis de composants de la cellule hôte et empêcheraient la diffusion de petites molécules. Ils participeraient à l'hydrophobicité de l'enveloppe avec les lipides capsulaires (croissance en surface de milieux liquides) et seraient également impliqués dans des

interactions de type lectines, expliquant pour une part les phénomènes d'agrégation observés dans les cultures en milieu liquide.

3.3.2. Protéines

La capsule contient de nombreuses protéines excrétées (24 kDa, 45–47 kDa) ou résidentes (lipoprotéines 19 kDa et 38 kDa, 30–31 kDa). Certaines de ces protéines jouent un rôle dans la virulence comme la protéine 30–31kDa qui est capable de fixer la fibronectine et serait impliquée dans la phagocytose par les cellules macrophagiques. Plus récemment, une protéine de 29 kDa a été identifiée comme sidérophore, permettant la croissance des mycobactéries dans des conditions de déficience en fer. Seul un petit nombre de ces protéines externes a été caractérisé immunologiquement.

3.3.3. Lipides

Les glycolipides présents dans la capsule des mycobactéries représentent 2 à 3 % de la masse de celle-ci et sont situés préférentiellement au niveau interne de la capsule sauf ceux portant une spécificité d'espèce. Ils sont regroupés en trois classes majeures en fonction de leur structure : glycolipides phénoliques, lipo-oligosaccharides à tréhalose et glycopeptidolipides. Les autres glycolipides sont des sulfolipides, des phtiocérol dimycocérosates et des phosphatidyl innositol mannosides.

3.3.3.1. Glycolipides phénoliques

Les glycolipides phénoliques (GLP) sont des structures présentes chez certaines espèces de mycobactéries (*M. leprae, M. bovis* BCG, *M. tuberculosis* souche Canetti, *M. marinum, M. kansasii*...). Ils sont formés d'un core lipidique lié à une partie glycanique. La partie aglucone (phénolphtiocérol) est constituée d'une chaîne carbonée (30 atomes) estérifiée par deux acides mycocérosiques (acides gras). La partie glycanique est reliée au core par l'intermédiaire du noyau phénol. Cette partie présente des variations de taille (une à quatre unités) et de structure (rhamnose, fucose, glucose), mais la spécificité d'espèce est portée par la dernière unité saccharidique. PGL-1 de *M. leprae* supprime la réponse oxydative des macrophages et est capable de neutraliser les radicaux superoxydes.

3.3.3.2. Glycopeptidolipides

Les glycopeptidolipides (GPL) à mycoside-C ou apolaire sont limités au genre *Mycobacterium* et sont présents dans un nombre limité d'espèces à croissance lente et à croissance rapide ne possédant pas de glycolipides phénoliques. Ils constituent le composant majeur de la capsule des mycobactéries du complexe aviaire. Leur structure se compose d'une partie lipidique (acide gras C_{26-34}) liée à un tripeptide (Phe-Thr-Ala) lui-même portant un oligosaccharide spécifique d'espèce qui a permis chez *M. avium* de définir des sérotypes dans cette espèce. La présence de cette structure est associée à un morphotype lisse. Un autre type de glycopeptidolipides (à sérine) a été décrit chez *M. xenopi* où ils déterminent également des sérotypes. Il est composé d'un acide gras linéaire en C_{12} lié à un tétrapeptide (L-Ser) $_2$-L-Phe-D-Thr. La chaîne glycanique est greffée au niveau du résidu Thr et porte également un acide gras en C_{12}.

Les glycopeptidolipides ont été utilisés pour identifier et classer les mycobactéries non tuberculeuses. Leur rôle dans la physiopathologie reste encore à élucider.

3.3.3.3. Dimycolates de tréhalose et sulfolipides

Le regroupement des souches de mycobactéries de tuberculose virulentes a été observé depuis longtemps. La structure chimique pariétale responsable de ce phénomène (*cord factor*) est le 6,6'-dimycolate de α, α'-D-tréhalose (TDM) dont la biosynthèse est relativement bien connue. Parmi les nombreuses activités biologiques putatives du TDM, on peut citer la toxicité pour la souris par action sur les mitochondries, son activité antitumorale et son rôle d'adjuvant.
Les sulfolipides sont des sulfates acyl-tréhaloses ayant une activité similaire au TDM sur la membrane des mitochondries et jouent un rôle dans la pathogenèse de la tuberculose (sécrétion de TNFα, inhibition de la fusion phagolysosomiale).

3.3.3.4. Autres lipides

Parmi les autres lipides présents au niveau de la capsule, les lipo-oligosaccharides à tréhalose sont des formes multiglycosylées (4 à 13 unités) du tréhalose présentes chez certaines espèces dont *M. tuberculosis* souche Canetti. La partie glucidique est reliée à une partie lipidique (trois acides gras à chaîne courte). Comme pour les glycolipides, la spécificité d'espèce est portée par l'unité terminale.
Les autres glycolipides sont des phosphatidyléthanolamine, des phtiocérols dimycocérosates, et des phosphatidylinositol mannosides.

3.4. Architecture générale et fonctions de l'enveloppe des mycobactéries

Deux principaux modèles d'architecture de la paroi s'appuyant sur des études de diffraction en rayon X et sur la microscopie électronique ont été proposés. Les deux modèles divergent sur la localisation des chaînes alkyles longues des acides mycoliques. Dans le modèle de Minnikin modifié par Brennan, celles-ci sont intercalées avec les chaînes alkyles des lipides de l'enveloppe (glycolipides phénoliques, lipo-oligosaccharides, glycopeptidolipides, phtiocérol dimycocérosates, sulfolipides, et phosphatidyl inositol mannosides). Le modèle de Rastogi propose une juxtaposition de ces chaînes, entraînant la formation d'une double couche lipidique. Les différences dans l'organisation de la paroi présentées par ces modèles soulignent la complexité d'analyse de cette structure. Ces modèles ont été modifiés notamment par Liu qui suggère la présence de triglycérides au niveau de la paroi s'intercalant au niveau des acides mycoliques.
L'enveloppe a une fonction de barrière de perméabilité. Les composés hydrophiles pénètrent par les porines et les composés lipophiles à travers une bicouche lipidique constituée des acides mycoliques et des lipides de la capsule (GPL, GLP...). Des études de perméabilité avec des β-lactamines plus ou moins hydrophiles chez *M. chelonae* à croissance rapide ont permis de suspecter l'existence de structures analogues aux protéines de la membrane externe des

bacilles à Gram négatif (porines). Ces résultats ont été confirmés en reproduisant la formation de pores sur des membranes artificielles à partir de protéines de la paroi purifiées. Ces porines sont situées au niveau de la paroi (couche des acides mycoliques) et de la capsule. Le séquençage du génome de *M. tuberculosis* a permis d'identifier une séquence ayant une homologie avec la séquence codant des protéines de la membrane externe des bacilles à Gram négatif (OmpA). Cette porine de 38 kDa, appelée OmpATb, permettrait le transport de petites molécules hydrophiles à travers la capsule et la barrière lipide externe que constituent les mycolates et les différents lipides capsulaires.
Les composés lipophiles comme certains antibiotiques (rifamycines, cyclines, fluoroquinones, macrolides) utiliseraient la voie de film lipidique pour traverser la paroi. La différence de sensibilité aux antibiotiques, observée chez les différentes espèces du genre, est probablement expliquée par des différences dans la composition de l'enveloppe. De même, cette différence de composition joue un rôle dans la physiopathologie (interactions avec les composants de la cellule hôte, inhibition de la fusion phagolysosomiale, inhibition de l'opsonisation...) et expliquerait pour une part l'éventail du pouvoir pathogène des infections à mycobactéries (commensalisme, infections opportunistes, infections spécifiques, latence et chronicité).

4. Métabolisme

Dans ce paragraphe, seuls seront abordés les aspects du métabolisme spécifique des mycobactéries. Les mycobactéries ont la potentialité de dégrader les lipides et les phospholipides pour assimiler les acides gras et synthétiser ensuite les nombreux composants lipidiques de sa paroi. De manière analogue, les mycobactéries disposent dans leur environnement des acides aminés nécessaires à la synthèse des protéines et n'ont pas la nécessité d'exprimer l'équipement enzymatique pour leur synthèse. Cependant, les mycobactéries, qui ne sont pas des pathogènes intracellulaires obligatoires, ont gardé la possibilité de synthétiser les éléments essentiels à leur survie. Les mycobactéries n'ont donc pas d'exigences, excepté *M. paratuberculosis* et certaines souches de *M. avium* (mycobactine), de *M. haemophilum* (hémine) et de *M. leprae* (tissu). L'oxygène est nécessaire à leur développement et explique pour une part leur croissance lente in vivo et leur possibilité de réprimer les activités oxydatives pour se placer en « dormance » en présence de faibles quantités d'oxygène.

4.1. Métabolisme du fer

Les mycobactéries ont besoin de fer pour leur croissance. Le fer est un cofacteur de nombreuses enzymes impliquées dans les principales voies métaboliques et de synthèse. Des preuves indirectes de cette exigence en fer ont été données in vivo (la correction d'une carence martiale a permis le développement de tuberculose active) et in vitro (inhibition de la culture de *M. tuberculosis* par addition d'haptoglobine ou de transferrine).
Le fer est souvent en concentration faible dans l'environnement et dans les cellules des mammifères. Pour obtenir ce fer, les bactéries ont développé des chélateurs ayant une grande affinité pour le fer (sidérophores). Les principaux

sidérophores sont l'exochéline, l'exomycobactine (sécrétées) et la mycobactine associée à la paroi. Certaines espèces ne produisent que certains de ces sidérophores. Les sidérophores sécrétés captent le fer dans l'environnement, notamment aux dépens des transporteurs comme la transferrine, et le transfèrent aux sidérophores situés dans la paroi facilitant le transport du fer vers le cytoplasme. Le fer est stocké dans la bactérie lié à une protéine (bactérioferritine). Les différentes mycobactines isolées de nombreuses espèces ont une structure commune (2-hydroxyphenyloxazoline lié à un résidu ε-N-hydroxylysine par un pont amide) avec des radicaux greffés. Les exochelines ont une structure de penta- ou d'heptapeptides incluant des résidus ornithine, alanine, histidine et thréonine.

La régulation du métabolisme implique l'action de plus de 25 protéines chez *M. tuberculosis*. Le gène *irpA* codant la protéine Irp10 a une structure voisine des gènes codant des protéines de choc thermique. Dans des conditions de carence en fer, ce gène se fixerait dans une région en amont d'une ATPase transporteuse de cation. Des implications cliniques à l'étude de ce métabolisme sont importantes, notamment la recherche de nouveaux antituberculeux comme l'indique l'utilisation d'un analogue de structure des mycobactines : l'acide para-amino-salicylique, antituberculeux de seconde ligne.

4.2. Réponse au stress oxydatif

Les mycobactéries sont des bactéries aérobies. Pour se protéger de l'action des radicaux oxygénés libres générés par les macrophages, les mycobactéries possèdent une série d'enzymes protectrices (catalase, peroxydase, superoxyde dismutase). La réponse au stress oxydatif varie en fonction des espèces de mycobactéries. Le rôle du gène *oxyR* est important dans cette réponse, mais n'explique pas la variété de réponses observées : par exemple, le gène est présent et fonctionnel chez *M. avium* qui n'induit pas de réponse.

Ces différences de réponse sont importantes à considérer en fonction du pouvoir pathogène des espèces. Les mycobactéries de la tuberculose exposées aux radicaux libres libérés par les macrophages n'induisent pas de réponse (gène *oxyR* non fonctionnel) et pourtant sont protégées de celui-ci, probablement par les composants de sa paroi (LAM, PGL-1, acides mycoliques).

Le métabolisme de l'oxygène joue également un rôle majeur dans la résistance aux antibiotiques. Par exemple, lors de l'activation de l'isoniazide (prodrogue) par le système catalase-peroxydase codée par le gène *katG*, une production de radicaux oxygénés serait induite conduisant à une destruction plus rapide des bactéries.

5. Conclusion

Les études génétiques et plus particulièrement le séquençage de *M. tuberculosis*, de *M. leprae*, de *M. bovis* permettent déjà et vont permettre de nouveaux développements dans le domaine de la protéomique et de la connaissance du métabolisme bactérien et ainsi ouvrir de nouveaux champs de recherche dans la découverte de nouvelles molécules antimycobactériennes, de nouveaux candidats vaccins en relation avec une meilleure connaissance des mécanismes immunologiques.

Pour en savoir plus

Asselineau C, Asselineau J, Lanéelle G, Lanéelle MA. The biosynthesis of mycolic acids by mycobacteria : current and alternative hypotheses. Prog Lip Res 2002 ; 41 : 501-23.

Brennan PJ Draper P. Ultrastructure of *Mycobacterium*. In : Bloom BR, Ed. Tuberculosis : pathogenesis, protection, and control. Washington, DC : ASM Press ; 1994. p. 271-84.

Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. Annu Rev Biochem 1995 ; 64 : 29-63.

Brosch R, Gordon SV, Eiglmeier K, Garnier T, Tekaia F, Yeramian E, et al. Genomics, biology, and evolution of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. In : Hatfull GF, Jacobs WR, Eds. Molecular genetics of mycobacteria. Washington, DC : ASM Press ; 2000. p. 19-36.

Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc Natl Acad Sci USA 2002 ; 99 : 3684-9.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature 1998 ; 393 : 537-44.

Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. Nature 2001 ; 409 : 1007-11.

Crick DC, Mahapatra S, Brennan PJ. Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. Glycobiology 2001 ; 11 : 107R-18R.

Daffé M, Draper P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. Adv Microb Physiol 1998 ; 39 : 131-203.

De Voss JJ, Rutter K, Schroeder BG, Barry CE. Iron acquisition and metabolism by mycobacteria. J Bacteriol 1999 ; 181 : 4443-51.

Draper P. The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers. Front Biosci 1998 ; 15 : 1253-61.

Le Dantec C, Winter N, Gicquel B, Vincent V, Picardeau M. Genomic sequence and transcriptional analysis of a 23-kilobase mycobacterial linear plasmid : evidence for horizontal transfer and identification of plasmid maintenance systems. J Bacteriol 2001 ; 183 : 2157-64.

Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, Gilbert M, Vincent V, Gicquel B, et al. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. Proc Natl Acad Sci USA 2001 ; 98 : 1901-6.

Minnikin DE. Lipids : complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles. In : Ratledge C, Stanford J, Eds. The biology of mycobacteria. Vol 1. London : Academic Press ; 1982. p. 271-84.

Picardeau M, Vincent V. Characterization of large linear plasmids in mycobacteria. J Bacteriol 1997 ; 179 : 2753-6.

Poulet S, Cole ST. Characterization of the highly abundant polymorphic GC-rich-repetitive sequence (PGRS) present in *Mycobacterium tuberculosis*. Arch Microbiol 1995 ; 163 : 87-95.

Puzzo G. La paroi mycobactérienne : structure et organisation des glycoconjugués majeurs. Ann Inst Pasteur 1993 ; 4 : 225-38.

Rastogi N. Recent observations concerning structure and function relationships in the mycobacterial cell envelope : elaboration of a model in terms of mycobacterial pathogenicity, virulence and drug-resistance. Res Microbiol 1991 ; 142 : 464-76.

Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, et al. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. Proc Natl Acad Sci USA 1997 ; 94 : 9869-74.

van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections : main methodologies and achievements. J Intern Med 2001 ; 249 : 1-26.

Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy : the new mycobacteria of the 1990s. Clin Microbiol Rev 2003 ; 16 : 319-54.

Vincent V, Brown-Elliott BA, Jost JKC, Wallace JRJ. *Mycobacterium* : phenotypic and genotypic identification. In : Murray PR, Baron EJO, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yolken RH, Eds. Manual of clinical microbiology, 8th ed. Washington DC : ASM Press ; 2003. p. 560-84.

Weeler PR, Ratledge C. Metabolism of *Mycobacterium tuberculosis*. In : Bloom BR, Ed. Tuberculosis. Pathogenesis, protection, and control. Washington DC : ASM Press ; 1994. p. 353-85.

Mycobacterium tuberculosis et mycobactéries atypiques

Chapitre 8

Diagnostic bactériologique des infections à mycobactéries

Christian Martin, Véronique Vincent, François Denis

Par leurs aspects cliniques et épidémiologiques, les infections dues à des mycobactéries sont divisées en deux grandes entités : la tuberculose, dont les agents étiologiques sont les bacilles tuberculeux (*Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis, Mycobacterium africanum*), et les mycobactérioses provoquées par les mycobactéries dites « atypiques ». Cette distinction n'est pas retrouvée au niveau des premières étapes du diagnostic bactériologique (examen direct, culture, identification) qui demeurent « universelles », excepté pour certaines des méthodes d'identification et de détection du génome.
Par rapport aux méthodes usuelles de bactériologie, les particularités de l'étude et du diagnostic des infections à mycobactéries sont liées à leur temps de croissance long et à la nécessité de concentrer et d'éliminer les bactéries commensales des prélèvements (décontamination). Ces particularités induisent respectivement des résultats de culture différés et un travail technique conséquent au niveau de l'ensemencement. L'apport de la biologie moléculaire dès le début des années 1990 a cependant permis l'identification rapide des cultures de mycobactéries les plus fréquemment isolées en pratique médicale et secondairement une détection directe du génome bactérien à partir des prélèvements.
La confirmation bactériologique du diagnostic de la tuberculose ou de mycobactériose doit, dans tous les cas, être apportée. Le diagnostic bactériologique comprend obligatoirement un examen direct et une culture. L'isolement de la souche donnera lieu à une identification et systématiquement à une étude de la sensibilité aux antituberculeux majeurs pour les mycobactéries de la tuberculose. Parmi les techniques de détection (amplification génomique) et de diagnostic rapide (antigènes solubles urinaires, anticorps) récemment développées, seule la détection après amplification présente actuellement un intérêt démontré.
Les marqueurs épidémiologiques ne sont pas abordés dans ce chapitre, cet aspect étant développé dans le chapitre 9.

1. Démarche diagnostique

Le diagnostic bactériologique est un diagnostic direct, le plus souvent conventionnel (examen direct et mise en culture du prélèvement, étude de la sensibilité aux antituberculeux majeurs), ou moléculaire (amplification génique). L'inoculation à l'animal demeure seulement utile pour isoler, à partir d'un produit pathologique, une mycobactérie du complexe de la tuberculose à partir d'un mélange de mycobactéries. Les différentes étapes du diagnostic des mycobactéries sont présentées Fig. 8.1.
Les règles de sécurité concernant la protection des personnes effectuant le prélèvement ou son recueil, l'acheminement des prélèvements et les étapes du diagnostic au laboratoire font l'objet d'un chapitre spécifique (chapitre 12). Des règles simples peuvent être ici rappelées comme le port du masque spécifique lors de l'entrée dans la chambre, l'utilisation de récipients fermant hermétiquement, l'observation des règles d'acheminement pour les substances infectieuses, la manipulation des prélèvements sous des postes de sécurité, l'utilisation de centrifugeuses munies de capot de sécurité évitant la propagation d'aérosols...

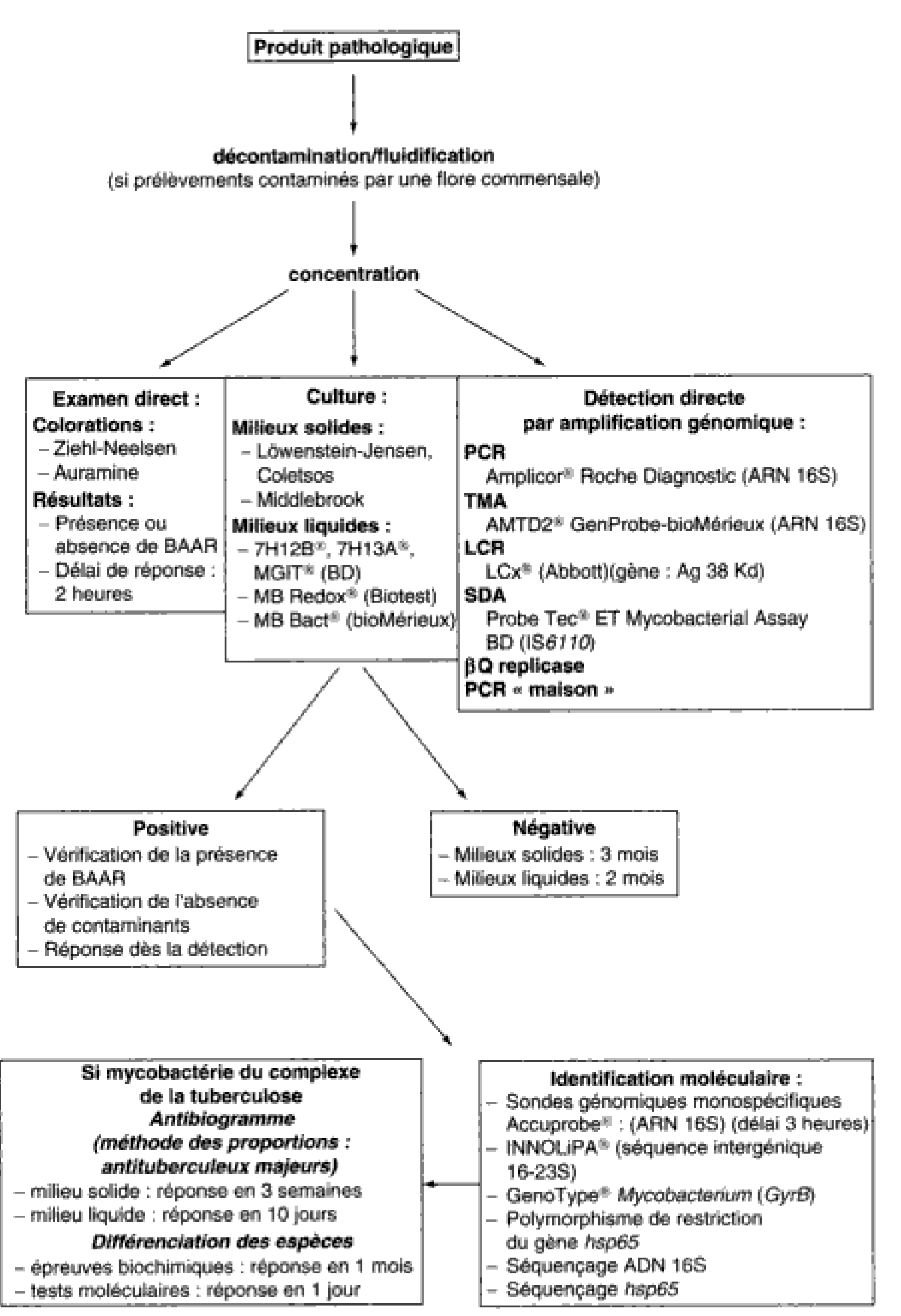


Figure 8.1. Principales étapes du diagnostic bactériologique des infections à mycobactéries.

2. Prélèvements

La qualité du prélèvement, comme dans toute recherche bactériologique, conditionne la valeur de l'examen. La majorité des prélèvements (85 %) ont une origine bronchopulmonaire (expectorations, tubages, aspirations bronchiques). Les autres prélèvements sont des prélèvements d'urines, des produits de ponction (liquides céphalorachidiens, liquides pleuraux, abcès, ganglions) et des biopsies. L'émission bacillaire étant intermittente, les prélèvements bronchopulmonaires (expectorations et tubages gastriques) et urinaires doivent être répétés si possible trois jours de suite et traités séparément. Une seconde série de prélèvements peut aussi être réalisée en cas de forte suspicion de tuberculose.
Les prélèvements initiaux sont réalisés chez des sujets sans antibiothérapie antituberculeuse (excepté lors de la surveillance du traitement).

2.1. Nature, recueil et transport

En dehors des recherches spécifiques de mycobactéries dans les prélèvements pulmonaires, une analyse bactériologique standard pour déceler des bactéries pyogènes devra être menée en parallèle.
Les prélèvements respiratoires (expectorations, tubages gastriques, liquides broncho-alvéolaires) sont recueillis dans des tubes stériles à centrifuger à vis de 50 ml fermant de manière hermétique pour éviter tout risque de contamination.
Les prélèvements extrapulmonaires sont recueillis dans des pots stériles.
La conservation des prélèvements à 4 °C en vue d'un examen différé de 72 h permet en limitant la pullulation des bactéries commensales un examen complet fiable (examen direct et culture). L'adjonction d'antibiotiques (pénicillines) permet d'obtenir le même résultat, mais présente l'inconvénient d'une manipulation supplémentaire.

2.1.1. Prélèvements respiratoires

Les expectorations spontanées sont recueillies après un effort de toux le matin au lever. Si le sujet ne tousse pas, les expectorations sont provoquées par inhalation d'un aérosol de sérum physiologique ou après kinésithérapie.
Les tubages gastriques permettent le recueil des sécrétions bronchiques dégluties au cours de la nuit. Ils sont réalisés au lit du malade chez un sujet alité depuis la veille et à jeun en utilisant une sonde à usage unique présentant des repères (arcades dentaires, cardia, pylore).
Les aspirations bronchiques, les brossages et les liquides de lavages alvéolaires recueillis lors d'une fibroscopie sont aussi contributifs dans le diagnostic de tuberculose. À la suite de ces examens endoscopiques, les recherches par tubages se révèlent souvent positives. Ces prélèvements respiratoires génèrent des aérosols et doivent être réalisés en prenant les précautions d'usage pour éviter la contamination des malades proches et du personnel.

2.1.2. Urines

Après restriction hydrique la veille du prélèvement, 50 ml des urines du matin sont prélevés dans un pot stérile. En pratique, en l'absence de fortes présomptions de tuberculose rénale, seules les urines présentant une pyurie aseptique (leucocyturie supérieure à 10 000/ml) seront ensemencées.

2.1.3. Hémocultures

La recherche de mycobactéries dans le sang est pratiquée à partir de sang prélevé par ponction veineuse et recueilli dans un tube contenant un anti-coagulant liquide (SPS, citrate, héparine).

2.1.4. LCR et liquides d'épanchements (ascites, pleuraux, articulaires)

Un volume de 3 ml est nécessaire à l'étude cytobactériologique de ces prélèvements. Dans les méningites tuberculeuses, la cytologie montrera une leucocytorachie modérée (100/mm^3) avec une prédominance de lymphocytes, l'étude biochimique menée parallèlement montrera une glycorachie et un taux de chlorure diminué et une protéinorachie légèrement augmentée (< 1 g/l).

2.1.5. Ponctions d'abcès

Le prélèvement à la seringue doit être privilégié et la seringue adressée directement au laboratoire. Les prélèvements à l'écouvillon sont déposés dans un flacon stérile et humidifiés avec quelques gouttes d'eau distillée stérile ou d'eau physiologique stérile.

2.1.6. Biopsies et pièces opératoires

Le prélèvement effectué stérilement est envoyé dans un flacon stérile contenant un petit volume d'eau stérile. Les prélèvements biopsiques envoyés dans un liquide fixateur (Boin...) sont impropres à l'étude bactériologique. Si le laboratoire est situé à l'extérieur de la structure ayant effectué le prélèvement, celui-ci devra être transporté à 4 °C après avoir été conditionné selon les normes en vigueur.

2.2. Décontamination, fluidification, concentration

En fonction du caractère polymicrobien ou monobactérien, les prélèvements vont faire l'objet ou non d'une décontamination. Cette étape a pour but d'éliminer la flore commensale des échantillons qui envahirait les milieux de culture avant la détection des mycobactéries qui sont des bactéries à croissance lente. Les mycobactéries sont plus résistantes à l'action des antiseptiques, des acides et des bases dilués que les bactéries commensales. L'utilisation de tels produits permet une décontamination des prélèvements après adaptation des protocoles ; en effet, des conditions trop drastiques (temps prolongé, concentration en solution de décontamination trop élevée) détruiraient l'ensemble des mycobactéries présentes. C'est pourquoi les liquides de ponction, les ponctions de collections fermées ou les biopsies prélevés stérilement sont ensemencés sans décontamination après centrifugation. Les autres prélèvements considérés comme polybactériens (tubages, expectorations, liquides d'aspiration bronchique, urines, abcès fistulisés...) sont soumis à une méthode de fluidification-homogénéisation-décontamination.

La technique la plus fréquemment utilisée (Fig. 8.2) associe l'action décontaminante d'une solution de soude à l'action mucolytique de la N-acétyl-L-cystéine en présence de citrate de sodium. Cette solution de décontamination est

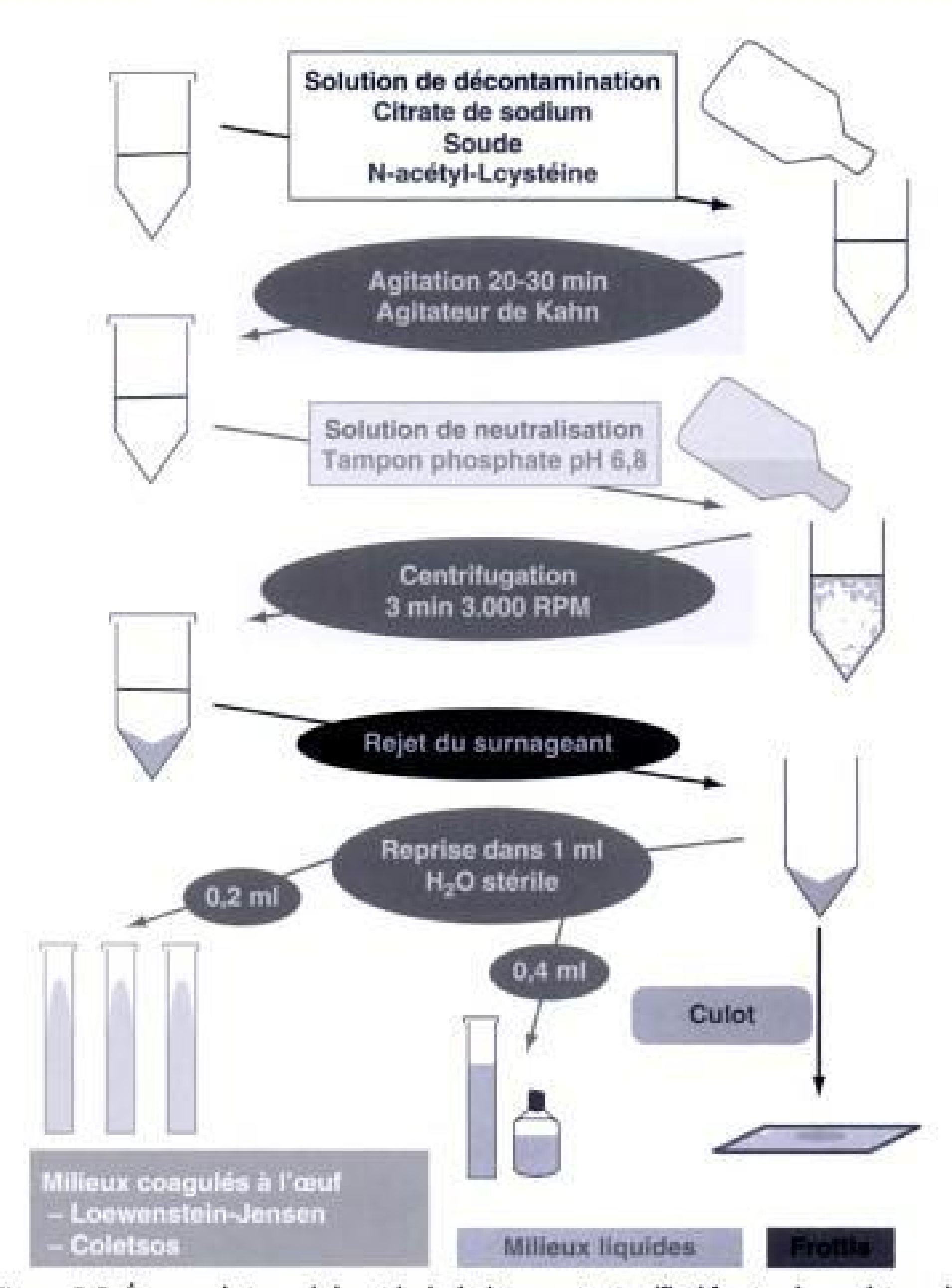


Figure 8.2. Étapes techniques de la méthode de décontamination/fluidification des produits pathologiques contaminés.

mise en présence d'une quantité égale de produit pathologique puis agitée à l'aide d'agitateur de type Kahn. La décontamination est arrêtée après 20 min de contact par neutralisation à l'aide d'un tampon phosphate (pH 6,8). Cette méthode est préconisée pour l'ensemencement des prélèvements en milieux liquides. Des réactifs destinés à réaliser cette technique sont commercialisés en coffrets afin de standardiser les procédures.

D'autres méthodes moins fréquemment répandues, utilisant la soude à 4 % (méthode de Petroff), l'acide oxalique à 5 %, l'acide sulfurique à 4 % ou le chlorure de benzalkonium sont assez agressives, d'autres plus douces associant le lauryl-sulfate de sodium et la soude, sont utilisées dans des laboratoires n'utilisant pas la respirométrie radiométrique (voir Annexes).

La concentration et le temps d'action de l'agent décontaminant sont des paramètres essentiels afin d'obtenir une élimination des contaminants sans altérer la viabilité des mycobactéries. Un taux de 2 à 5 % de cultures contaminées est acceptable. Un taux supérieur ou inférieur nécessite un ajustement de la méthode.
Après neutralisation, le culot obtenu après 15 min de centrifugation à 3 000 rpm permet la confection de frottis en vue de l'examen direct, la mise en culture sur milieux spécifiques de la croissance des mycobactéries et la détection par une méthode d'amplification.

3. Examen microscopique

Les espèces du genre *Mycobacterium* sont difficilement colorées par la coloration de Gram. Le principe de coloration de ce genre est basé sur la propriété de l'acido-alcoolo-résistance (Ziehl-Neelsen, auramine).
Les frottis sont effectués soit après centrifugation (15 min de centrifugation à 3 000 rpm) pour les prélèvements non contaminés, soit à partir du culot de décontamination pour les autres prélèvements (respiratoires, urinaires).
Les lames utilisées pour la confection des frottis doivent être neuves et éventuellement dégraissées par un mélange acide sulfurique-alcool (90/10). Les solutions de coloration doivent être préparées avec de l'eau stérile (des mycobactéries sont parfois présentes dans l'eau du robinet).
Les frottis doivent être fins, pas trop étalés. Ils sont séchés sur plaque chauffante, puis fixés avec de l'alcool méthylique pur.

3.1. Techniques de coloration

Il existe deux groupes de technique de coloration (voir Annexes) :
– à la fuchsine de Ziehl-Neelsen ;
– à l'auramine pour examen par fluorescence.
Afin d'éviter la préparation des réactifs et pour mieux standardiser la méthode, des coffrets de réactifs prêts à l'emploi sont disponibles dans le commerce pour ces techniques de coloration.

3.1.1. Coloration de Ziehl-Neelsen

Le frottis est coloré par une solution alcoolique saturée de fuchsine basique phéniquée chauffée jusqu'à émission de vapeur pendant 5 min. Après décoloration avec un mélange acide-alcool (acide sulfurique à 25 % dans l'alcool à 90°), la lame est contre-colorée par une solution aqueuse de bleu de méthylène à 3 % (voir Annexes). Une technique à froid plus rapide peut être aussi réalisée. L'observation est effectuée à l'objectif × 100 à l'immersion avec de l'huile minérale.
Par cette technique, les mycobactéries colorées par la fuchsine phéniquée apparaissent en rouge vif sur le fond bleu de la préparation (débris cellulaires, mucus, bactéries commensales) (Fig. 8.3A, voir atlas couleurs page 296).
M. tuberculosis apparaît sous forme de bacille long, parfois d'aspect granuleux se regroupant en torsades ou en cordes si le frottis est réalisé à partir d'un milieu liquide (Fig. 8.3B, voir atlas couleurs page 296).

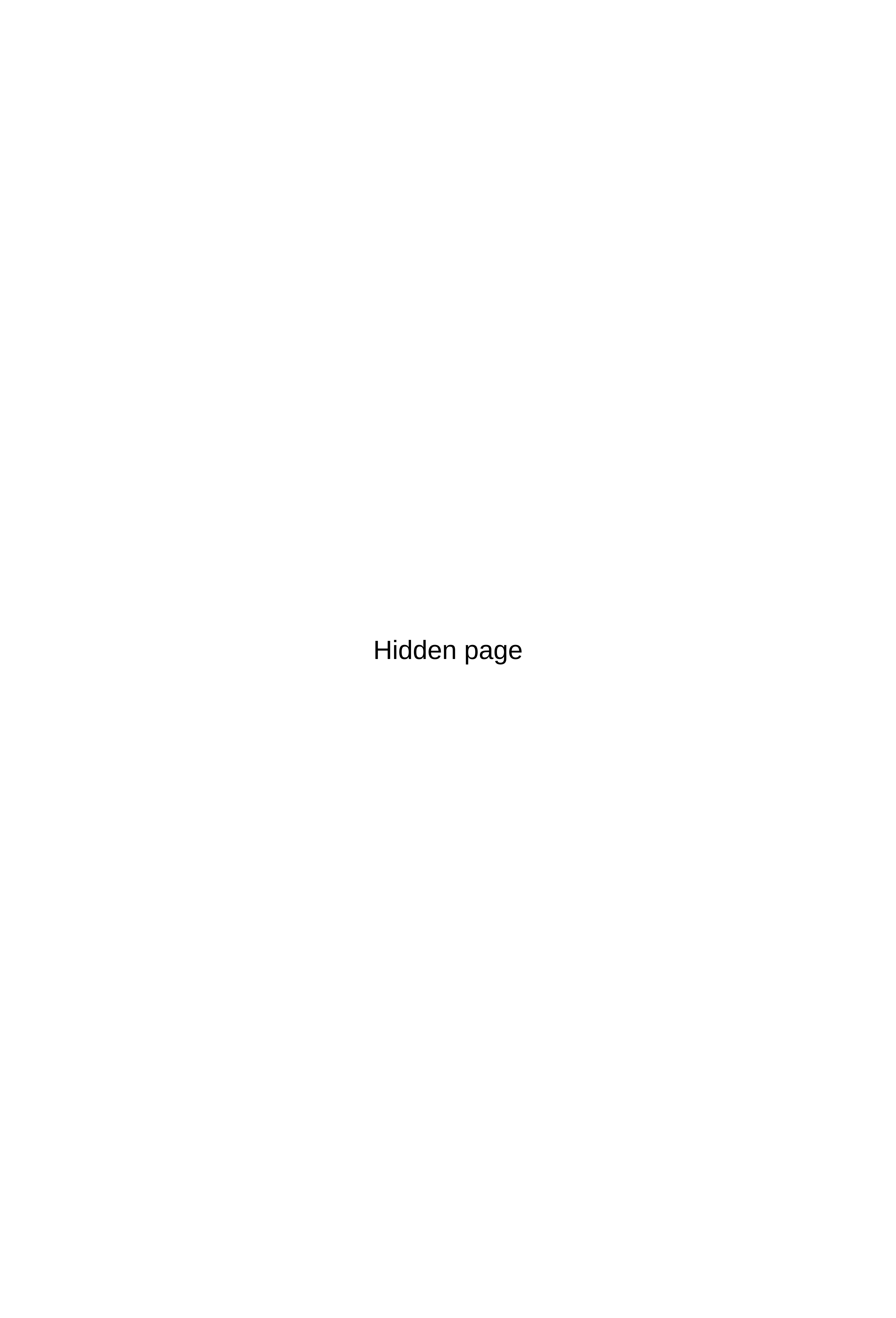

Hidden page

Tableau 8.2
Caractéristiques des milieux liquides commercialisés pour la culture des mycobactéries

Système	Milieux		Supplément*	Supplément**	Principe de détection	Mode***	Fabricant
	Standard	Hémoculture	Enrichissement	Antibiotiques			
Bactec TB460	7H9 (12B)	7H9 (13A)	Albumine catalase acide palmitique radio marquée (inclus)	PAzNTAm	Radioactivité CO_2	S	Becton Dickinson
MGIT 960	7H9 (MGIT)	/	OADC* (à ajouter)	PAzNTAm	Émission de fluorescence	A	Becton Dickinson
MB/BacT/ Alert 3D	MP/BacT	MB/BacT (sang)	Tween 80 glycerol amaranthe (inclus)	PAzNTAm	Colorimétrie	A	bioMérieux
ESP	7H9 (Myco ESP)	/	OADC*	PA_mNV	Pression	A	Becton Dickinson
MB Redox	Kirchner	/	Glycerol sérum de cheval (inclus)	PA_mCT	Précipité	V	Heipha Diagnostika Biotest

*OADC : acide oléique, albumine, dextrose, catalase ; **P : polymyxine B ; Am : amphotéricine B ; C : carbénicilline ; T : triméthoprime ; Az : azlocilline ; P : pipéracilline ; N : acide nalidixique ; ***S : semi-automate ; A : automate ; V : visuel.

4.1.1. Milieux solides

4.1.1.1. Milieux à l'œuf

Le milieu le plus utilisé pour l'ensemencement des produits pathologiques est le milieu de Löwenstein-Jensen à base de sels minéraux, de fécule de pomme de terre, de glycérine, de vert malachite (antiseptique) et d'œuf (albumine). L'adjonction de certains composés comme le pyruvate de sodium dans le milieu de Coletsos ou le citrate de fer favorise la croissance respectivement de *M. bovis* et *M. africanum* et de *M. haemophilum* (voir Annexes). Des antibiotiques (pénicilline, acide nalidixique) permettent de rendre le milieu sélectif (voir Annexes). Les milieux sont présentés sous forme de tubes fermés à vis ou par du coton et obturés par une capsule de plastique.
Trois gouttes du culot de centrifugation sont déposées au sommet de la pente gélosée. Deux à six tubes (selon le volume de l'échantillon) sont ensemencés et incubés à 37 °C, excepté pour les prélèvements d'origine cutanée et ostéo-articulaire incubés à 30 °C et à 37 °C. Les tubes sont incubés inclinés et incomplètement vissés afin de permettre l'évaporation de l'excès de liquide de l'échantillon.
Les milieux sont observés une fois par semaine pendant au moins huit semaines. L'observation des cultures la première semaine permettra de mettre en évidence une contamination par des bactéries commensales ou la présence d'une mycobactérie à croissance rapide. Dès l'apparition de colonies, un frottis coloré par la méthode de Ziehl-Neelsen sera effectué pour vérifier la présence de BAAR avant de déclarer la culture positive. Le nombre de colonies est noté ; nombre exact ou approximatif (< 50, 50–100, ..., > 200).
Sur milieu de Löwenstein-Jensen, les colonies de *M. tuberculosis* apparaissent après deux à trois semaines d'incubation (Fig. 8.4A, voir atlas couleurs page 297) en fonction de l'inoculum présent dans l'échantillon. Ces colonies sont lisses et crème sur les cultures jeunes puis atteignent plus de 5 mm de diamètre et deviennent beiges, rugueuses, à bords irréguliers en chou-fleur, dites « eugoniques ». Les colonies de *M. bovis* et *M. africanum* ont une croissance plus lente : trois à six semaines sur milieu de Löwenstein. Les colonies de *M. bovis* apparaissent plates, petites (1–2 mm), lisses, « dysgoniques », blanchâtres, brillantes, tandis que les colonies de *M. africanum* se présentent avec les caractéristiques suivantes : petites colonies rondes, mates, crème et granuleuses.
Les mycobactéries atypiques ont été classées par Runyon selon le délai d'apparition des colonies et leur pigmentation. Les deux espèces de mycobactéries du groupe I à croissance lente et à pigmentation photo-inductible les plus fréquemment rencontrées sont *M. marinum* et *M. kansasii*. Le groupe des mycobactéries scotochromogènes (groupe II) comprend des espèces saprophytes comme *M. gordonae*, ou pathogènes comme *M. szulgai* (Fig. 8.4B, voir atlas couleurs page 297). Les colonies de ces deux espèces sont eugoniques régulières brillantes orangées. À 30 °C, les colonies de *M. marinum* (Fig. 8.4C, voir atlas couleurs page 297) sont rondes, plus ou moins rugueuses, blanchâtres à l'obscurité et jaune orangé après exposition à la lumière. *M. kansasii* donnent des cultures avec des colonies irrégulières, eugoniques et jaune citron après exposition à la lumière. *Mycobacterium avium* (mycobactéries du groupe III à croissance lente et non pigmentées) a une croissance lente sans pigmentation, des colonies fines rondes bombées, lisses, brillantes, blanchâtres,

l'indice de croissance d'un flacon dépasse une valeur de croissance de 10, le flacon est soumis à une détection quotidienne. Un frottis coloré par la méthode de Ziehl-Neelsen est réalisé lorsque l'indice de croissance se situe à 100.
Le principal avantage de la respirométrie est la diminution du délai d'obtention des primocultures. Le délai moyen concernant les mycobactéries de la tuberculose est de 14 jours. Ce délai est de 28 jours par la méthode classique de culture sur milieu de Löwenstein. Ces délais sont à moduler selon la richesse bacillaire du prélèvement.
Les contraintes liées à l'utilisation de produits radioactifs (agrément du laboratoire, conformité des locaux, traitement et évacuation des déchets) et d'un semi-automate peu adapté à des laboratoires traitant de petites séries quotidiennes ont incité le développement puis la commercialisation de systèmes de détection non radioactifs en milieu liquide (MGIT, MB/BactT, ESP, MB Redox).

4.1.2.2. MGIT

Le milieu (MGIT, *mycobacteria growth indicator tube*) est un milieu 7H9 supplémenté contenant un indicateur de fluorescence sensible à la concentration du milieu en O_2 composé. Une diminution de la concentration en O_2 génère, après excitation à 365 nm, une fluorescence visible à l'œil nu ou détectable à l'aide d'un automate (MGIT 960, Becton Dickinson). L'inoculation des tubes ne nécessite pas l'utilisation d'aiguille. Une technologie utilisant le milieu Myco/F et le même système de détection couplé à un automate 9000MB a aussi été évalué et a montré des performances similaires aux systèmes MGIT et TB 460.

4.1.2.3. MB/BacT

La croissance (présence de CO_2) dans les flacons MB/BacT (bioMérieux) est détectée à la base du flacon par un indicateur colorimétrique sensible à l'augmentation du pH et reconnu par l'automate (BacT/Alert 3D). Comme pour le système MGIT, l'inoculation des tubes ne nécessite pas l'utilisation d'aiguille.

4.1.2.4. ESP culture system II

Le système ESP-culture system II (Becton Dickinson) est basé sur la surveillance de la diminution de pression intervenant dans le flacon de culture due à la consommation d'O_2 lors de la croissance bactérienne.

4.1.2.5. MB Redox

Le milieu MB Redox (Heipha Diagnostika/Biotest) est un milieu de Kirchner contenant un sel de tétrazolium incolore qui, pendant la croissance bactérienne, est réduit en formazan (rouge à violet) insoluble en milieu aqueux. Le formazan s'accumule à la surface sous forme de grains permettant de visualiser les microcolonies sous forme de particule colorée. Le virage coloré des particules est visible à l'œil nu.

4.1.2.6. Bio FM

Le milieu Bio FM (Bio Rad) est un milieu liquide Middlebrook 7H9 enrichi en OADC contenant un substrat chromogène. Les cultures positives présentent une coloration bleue pouvant atteindre le violet.

Tableau 8.3
Comparaison des taux de recouvrement des cultures positives et des temps de détection moyens des systèmes de culture pour mycobactéries

Milieux*	Nombre d'études	Nombre prélèvements**	Nombre prélèvements culture +	Recouvrement des cultures positives (en %)	Temps de détection moyen (en j)
Löwenstein-Jensen	20	35.410	3.554	68,7	26,3
ESP II	3	8.107	599	79,1	16,8
TB 460	22	37.258	7.198	84,8	14,2
MGIT	11	23.882	1.962	83,0	14,9
MB/BacT	9	15.686	1.116	87,5	14,6
MB Redox	5	6.994	857	78,2	18,1

*Références des milieux dans le texte ; **54,4 % de l'ensemble des cultures positives étaient à mycobactéries de la tuberculose.

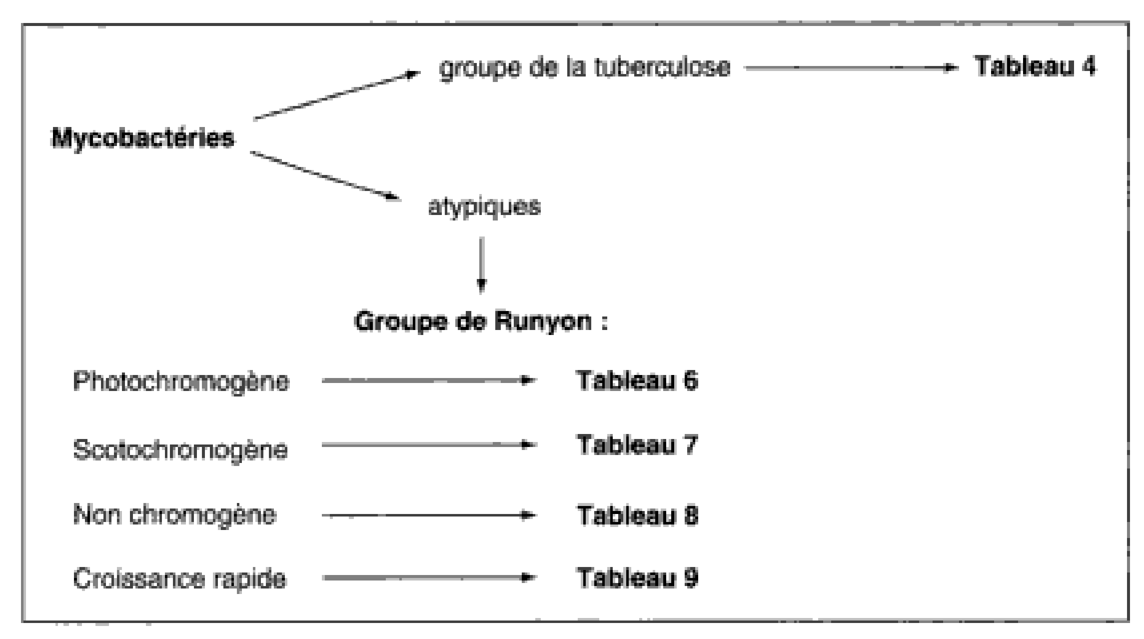


Figure 8.6. Organigramme des tableaux d'identification.

été récemment évaluée pour différencier sur culture les mycobactéries tuberculeuses des mycobactéries non tuberculeuses. La spécificité du test s'est révélée excellente à partir des cultures liquides des différents systèmes commercialisés ou de suspensions réalisées à partir de milieux solides, excepté pour certaines souches de *M. bovis* et de BCG qui ne produisent pas l'antigène MPB40.

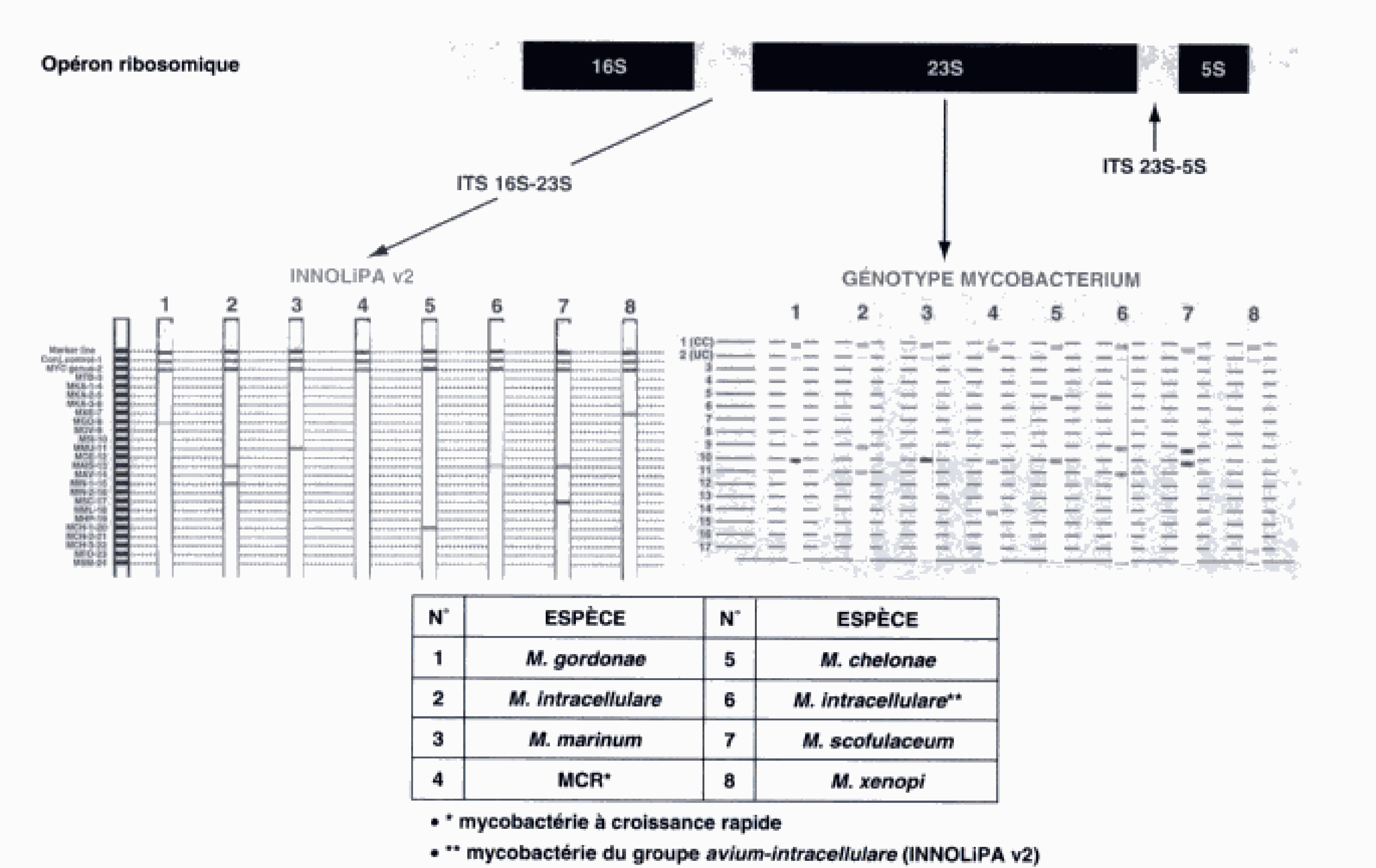
L'utilisation des méthodes moléculaires a permis de s'affranchir, dans la plupart des cas, de la détermination longue et fastidieuse des caractères métaboliques. Les régions de l'ADN les plus fréquemment utilisées par ces techniques sont les gènes codant les ARN 16S, les séquences intergéniques 16-23S, ADNr 23S, *recA, gyrB, hsp65*, et *rpoB*. Seuls certains tests phénotypiques d'orientation ou complémentaires sont utilisés couramment.

5.1. Identification des mycobactéries de la tuberculose

Quatre espèces de mycobactéries du complexe *tuberculosis* sont responsables d'infections chez l'homme (*M. tuberculosis, M. africanum, M. bovis* et le BCG). Ces bactéries ont été désignées en tant qu'espèces à une époque où la biologie moléculaire n'existait pas. Si la définition actuelle d'une espèce (génomique) était appliquée, ces quatre espèces « historiques » ne constitueraient plus qu'une seule espèce comprenant quatre « pathovars » ou « biovars ».

Depuis la fin des années 1980, une sonde commercialisée (Accuprobe®, Genprobe, bioMérieux) est disponible pour identifier les mycobactéries du groupe de la tuberculose.

Une sonde d'ADN complémentaire d'ARN ribosomal-16S marquée par un ester d'acridinium est mise en présence d'un lysat de culture (milieux solides ou milieux liquides). Après hybridation avec l'ARN ribosomal et élimination des fragments de sonde non hybridés, la sonde hybridée est détectée par chimioluminescence à l'aide d'un luminomètre. Cette sonde présente une très



N°	ESPÈCE	N°	ESPÈCE
1	*M. gordonae*	5	*M. chelonae*
2	*M. intracellulare*	6	*M. intracellulare***
3	*M. marinum*	7	*M. scofulaceum*
4	MCR*	8	*M. xenopi*

- * mycobactérie à croissance rapide
- ** mycobactérie du groupe *avium-intracellulare* (INNOLiPA v2)

Figure 8.7. Exemples de résultats d'identification obtenus par deux techniques d'hybridation inverse de produits de PCR avec des sondes spécifiques d'espèces fixées sur bandelette.

Tableau 8.4
Principe et caractéristiques des méthodes moléculaires d'identification des mycobactéries sur culture

Méthode	Accuprobe®	Inno-LiPA® Mycobacterium	GenoType® Mycobacterium	GenoType® MTBC	PRA	Séquençage *hsp65*	Séquençage ARN 16S
Fabricant	Gen Probe	Innogenetic	Hain-Diagnostika				
Principe de détection	Hybridation ARN/ADN	Hybridation ADN/ADN	Hybridation ADN/ADN	Hybridation ADN/ADN	Restriction	Séquençage	Séquençage
Gène cible	ARN 16S	ITS 16-23S	*gyrB*	*gyrB*	*hsp65*	*hsp65*	ARN 16S
Étape d'amplification	–	+	+	+	+	+	+
Type de méthode	Monospécifique	Polyspécifique	Polyspécifique	Polyspécifique	Universelle	Universelle	Universelle
Espèces							
MTB*	+	+	+	+****	Toutes, en théorie	Toutes, en théorie	Toutes, en théorie
MAC**	+						
MAIS***		+					
M. avium	+	+	+				
M. intracellulaire	+	+	+				
M. kansasii	+	+ (3 génotypes)	+				
M. gordonae	+	+	+				
M. xenopi		+	+				
M. chelonae		+ (4 génotypes)	+				
M. scrofulaceum		+	+				
M. celatum		+	+				

Tableau 8.5
Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des mycobactéries du complexe de la tuberculose

Caractères	*M. tuberculosis*	*M. africanum*	*M. bovis*	BCG
		Phénotypiques		
Morphologie des colonies	Rugueuse	Eugonique	Lisse	Rugueuse
Niacine	+	+/–	–	–
Nitrate réductase	+	+/–	–	–
TCH	R	R/S	S	S
Pyrazinamide	S	S	R	R
Tb1	S	S/R	S	R
D-cyclosérine	S	S	S	R
		Génotypiques		
mpt 40	+	+	–	–
pnc A (nucléotide 169)	C	C	G	G
oxy R (nucléotide 285)	G	G	A	A
Copies *IS*6110	1–20	15–16	< 5	1–2
Séquences inter DR 39–43	–	–	+	+
Locus MIRU 4 (nombre)	1	1	1	0
RD 1	+	+	+	–
RD 4	+	+	–	–
RD 9	+	–	–	–

polymorphisme du gène *gyrB* (GenoType® MTBC) et d'autres marqueurs moléculaires permet d'identifier précisément les mycobactéries de la tuberculose excepté *M. africanum* génotype I (Tableau 8.5). Le principal avantage tient à une identification rapide en une seule étape des mycobactéries de la tuberculose.

5.2. Identification des mycobactéries atypiques

5.2.1. Méthodes génotypiques

Les méthodes de détection et d'identification moléculaire sont réalisables à partir de culture en milieux solides ou liquides. Le principe et les espèces identifiées par ces techniques sont précisés dans le Tableau 8.4. Ces techniques peuvent être classées en trois grands groupes selon leur spectre d'identification : les sondes monospécifiques ou de complexes, les systèmes de détection après amplification et hybridation sur support solide identifiant 10 à 16 espèces et enfin les systèmes de détection universelle basés sur le séquençage ou la restriction enzymatique. La stratégie d'utilisation de ces techniques doit tenir compte pour un laboratoire du coût, de l'épidémiologie (plus de 50 % des souches isolées dans un laboratoire sont des mycobactéries de la tuberculose) et de son degré d'implication dans l'étude des mycobactéries. Les principaux avantages des sondes monospécifiques sont leur rapidité d'exécution sans un

appareillage sophistiqué et leur coût. Les techniques de détection sur support solide, plus longues d'exécution, ont, quant à elles, un spectre de détection plus large leur permettant de détecter un mélange et, pour certaines espèces, de préciser un génotype. Les techniques universelles permettent une approche sans a priori du spectre, mais sont souvent utilisées en seconde intention, surtout en ce qui concerne les techniques de séquençage (coût).

5.2.1.1. Sondes commercialisées

Des sondes commercialisées (Accuprobe®, Gen-probe, bioMérieux), basées sur le même principe que la sonde « *tuberculosis complex* », sont disponibles pour les espèces suivantes : mycobactéries du complexe aviaire (MAC), *M. avium, M. intracellulare, M. kansasii* et *M. gordonae*. La spécificité est bonne pour l'ensemble de ces sondes. En revanche, la sensibilité présente des résultats variables suivant les espèces ; bonne (100 %) pour *M. gordonae* mais plus modeste pour *M. avium* et *M. intracellulare* (95 %). La sonde MAC détecte certaines souches qui n'appartiennent pas aux espèces *M. avium* et *M. intracellulare*.

5.2.1.2. Détection du polymorphisme de la séquence intergénique 16S-23S

Les résultats de plusieurs études internationales publiés, avec le premier coffret commercialisé (Inno-LiPA®) détectant neuf espèces, montrent une bonne spécificité de cette méthode évaluée sur des souches de collection. Seules certaines souches de mycobactéries du complexe *avium* ne peuvent être identifiées précisément et nécessitent l'utilisation de méthodes complémentaires (polymorphisme de restriction du gène *hsp65*, séquençage des gènes *hsp65* et ARN 16S). Ce test permet un diagnostic d'orientation des souches de mycobactéries à croissance rapide, mais manque de spécificité pour certaines espèces du groupe *chelonae*.

5.2.1.3. Détection du polymorphisme du gène *ADNr 23S*

Une seule étude publiée évaluant le coffret GenoType® Mycobacterium sur 81 souches montre une spécificité supérieure à 95 %. Comme pour le réactif InnoLiPA®, les difficultés sont retrouvées au niveau des souches appartenant au complexe *avium intracellulare* témoignant de besoin de clarification taxonomique du groupe.

5.2.1.4. Polymorphisme de restriction du gène *hsp65*

Le gène *hsp65* code une protéine de choc thermique universelle. La sélection d'amorces spécifiques du genre *Mycobacterium* permet l'amplification d'une portion de 439 paires de bases de ce gène. Puis, l'amplicon est digéré séparément par *Bst*EII et *Hae*III. La taille des fragments est déterminée après séparation dans un gel d'agarose à 4 % de point de fusion bas. Les résultats de cette méthode appelé PRA (*PCR-restriction enzymatic analysis*) sont interprétés à l'aide d'un algorithme publié initialement par Telenti qui prend en compte dans un premier temps la taille des fragments obtenus après digestion avec *Bst*EII, puis la taille de bandes obtenues après restriction par *Hae*III. Des enzymes additionnelles (*Aci*I et *Cfo*I) ont été utilisées pour identifier les mycobactéries à croissance rapide. Des profils additionnels aux 28 espèces décrites initialement permettent d'identifier une cinquantaine d'espèces de mycobactéries. Cette

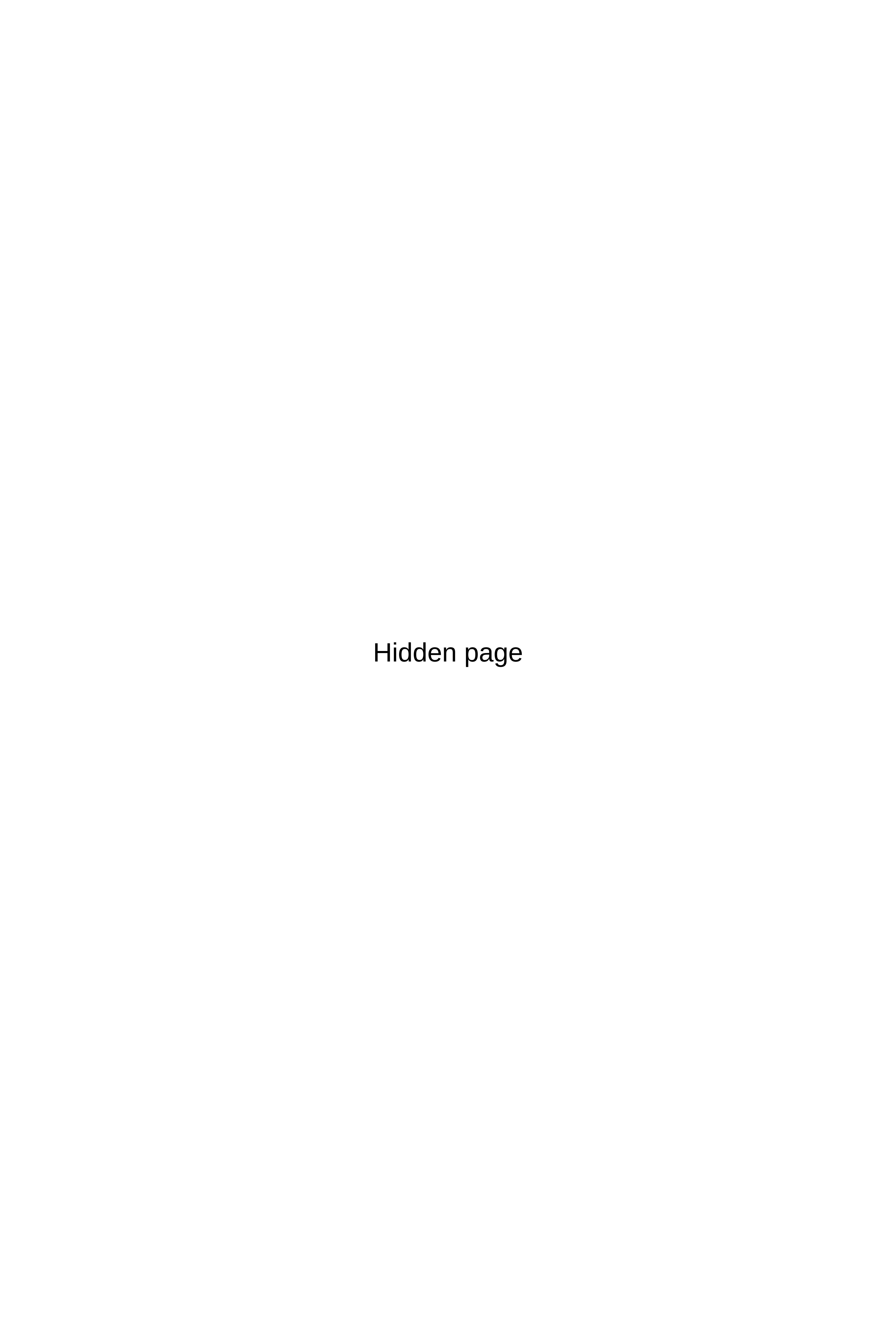


Tableau 8.9
Caractères culturaux et biochimiques distinctifs des souches de mycobactéries à croissance rapide

Tests/ espèces	*M. fortuitum*	*M. peregrinum*	*M. fortuitum* biovar III		*M. chelonae*	*M. abscessus*	*M. mucogenicum*	*M. smegmatis*	*M. senegalense*
			I	II					
Nitrate réductase	+	+	+	+	–	–	+/–	+	+
Catalase > 45 mm	+	ND	+	–	+	+	–	+	ND
NaCl à 5 %	+	+	+	+	+/–	+	–	+	+
Citrate de fer ammoniacal	+	+	+	+	–	–	–	+	–
Arylsulfatase (3 j)	+	+	+	+	+	+	+	–	+
Croissance sur :									
– citrate de Na	–	–	–	–	+	–	+	+/–	+
– mannitol	–	+	+	+	–	–	+	+	+
– inositol	–	–	+	+	–	–	–	+	ND
– sorbitol	–	–	+	–	–	–	–	+	–
– glucitol	–	–	+	–	–	–	–	ND	+

*MCLO : *Mycobacterium chelonae like-organism.*

Tableau 8.10
Coffrets d'amplification génomique commercialisés pour le diagnostic de la tuberculose pulmonaire sur produits pathologiques

Trousse	Amplicor®	AMTD®	LCx MTB®	BD Probe Tec®
Laboratoire	Roche Diagnostic	GenProbe bioMérieux	Abbott	Becton Dickinson
Méthode	PCR	TMA	LCR	SDA
Cible	ADN 16S	ARN 16S	ADN Ag b	ADN IS*6110*
Automatisation	Amplification Détection	En développement depuis 3 ans	Amplification Détection	Amplification Détection
Prise	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl
Détection	Colorimétrique	Fluorescence	Fluorescence	Fluorescence
Contrôle interne	Oui	Non	Non	Oui
Délai de réalisation	4–5 h	4 h	5 h	3 h
Principe	Fig. 8.8A, voir page 169	Fig. 8.8B, voir page 170	Fig. 8.8C, voir page 171	Fig. 8.8D, voir page 172

Pour éviter le monopole lié à l'utilisation de la *Taq* polymérase, de nombreux procédés ont été mis au point pour amplifier des séquences génomiques. Certaines d'entre elles sont maintenant commercialisées.

6.1.1.1. *Polymerase chain reaction* (PCR)

La technique de PCR est une technique d'amplification génique qui consiste à amplifier une séquence nucléotidique. À l'aide d'amorces encadrant cette séquence et l'activité polymérase d'une enzyme thermorésistante (*Taq* polymérase) (Roche Diagnostic), la cible est multipliée en plusieurs millions de copies au cours des 30 à 35 cycles de la réaction (Fig. 8.8A). La détection du produit d'amplification est réalisée par électrophorèse en gel d'agarose, éventuellement suivie d'un transfert et d'une hybridation sur membrane ou en milieu liquide.

6.1.1.2. Amplification transcriptionnelle

Cette technique associe l'action de deux enzymes (transcriptase inverse et une ARN polymerase) (Gene-Probe, bioMérieux). Dans une première étape, une amorce possédant une séquence promotrice se fixe sur un ADN ou un ARN cible et permet à la transcriptase inverse de générer un hétéroduplex (Fig. 8.8B). Après destruction du brin d'ARN par la RNAse, la transcriptase inverse synthétise un nouveau brin d'ADN. Cet ADN double brin en présence d'ARN polymérase permet la synthèse d'un millier de copies d'ARN cible qui seront à l'origine d'un nouveau cycle d'amplification. La technique NASBA (*nucleic acid sequence based amplification*), basée sur un principe similaire, est en développement (bioMérieux).

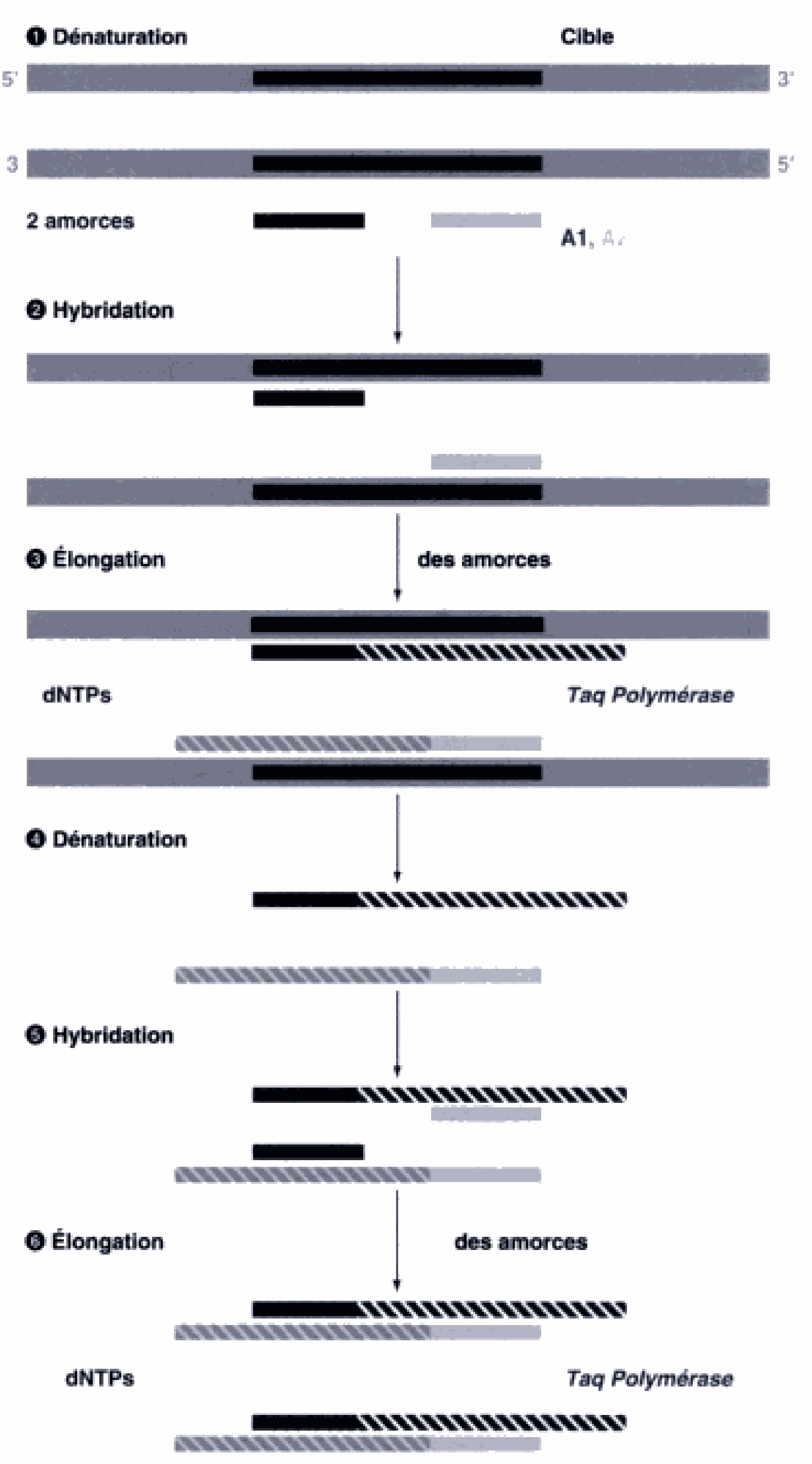


Figure 8.8. A. Principe de la PCR. DNTPs : désoxynucléotide triphosphate.

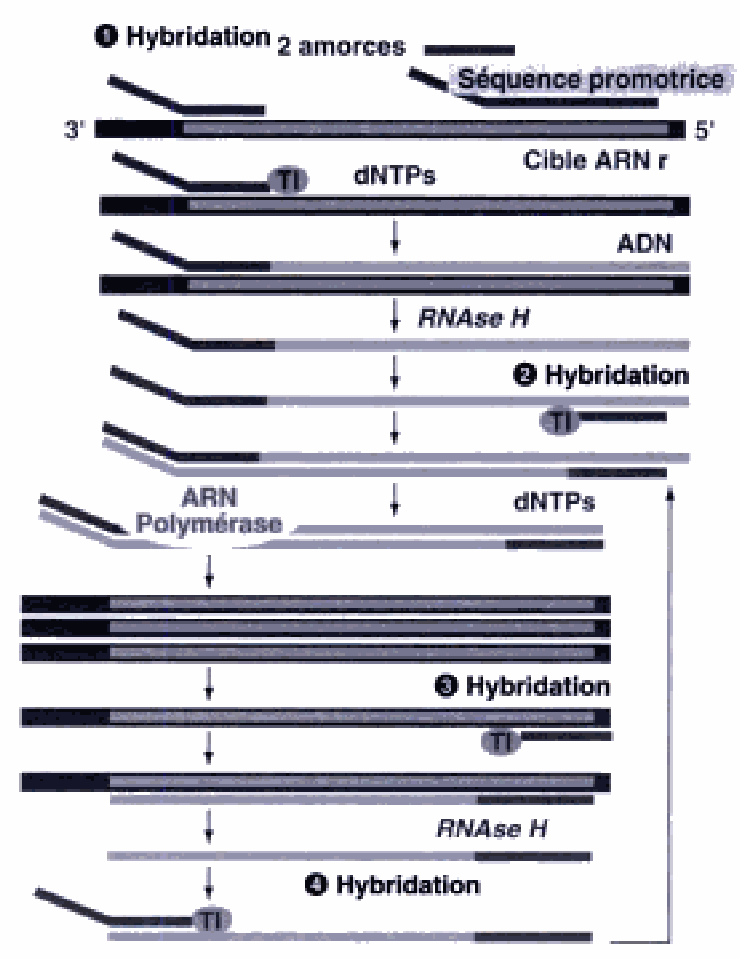


Figure 8.8. B. Principe de l'amplification transcriptionnelle. TI : transcriptase inverse.

6.1.1.3. Amplification – Ligation (*ligase chain reaction* : LCR ; Abbott)

Deux couples d'amorces s'hybridant chacun avec une séquence cible portée par chacun des deux brins sont ensuite réunis par l'action d'une ligase (T4 ADN ligase). Après dénaturation, ces produits de ligation complémentaires sont le support de nouvelles réactions avec les amorces présentes en excès dans le mélange réactionnel permettant une amplification exponentielle (Fig. 8.8C).

6.1.1.4. Amplification par déplacement de brin (*strand displacement amplification* : SDA ; Becton Dickinson)

Cette technique complexe utilise l'enzyme de Klenow dépourvue d'activité exonucléasique, une enzyme de restriction *Hinc*II, des désoxynucléotides dont l'un est modifié (dATP) et deux jeux d'amorces complémentaires (Fig. 8.8D). Après dénaturation, deux sondes dont celle située en 5' portant un site de restriction pour *Hinc*II s'hybrident sur chacun des brins. Lors de l'élongation, les sondes situées en aval sont déplacées puis déshybridées par l'élongation de la sonde en amont et deviennent des cibles pour l'autre jeu d'amorces. L'hybride restant porte un site de restriction *Hinc*II qui, après action de l'enzyme sur le seul brin natif (non modifié), va créer un site d'action pour la polymérase. À la différence de la réaction classique de PCR, cette réaction est

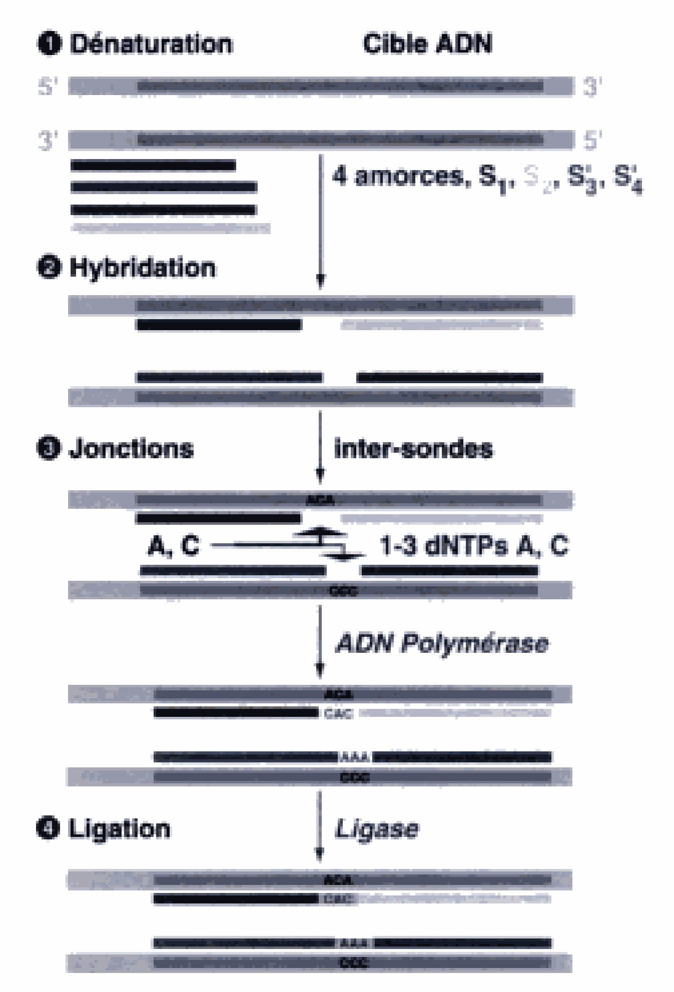


Figure 8.8. C. Principe de la méthode d'amplification-ligation.

isotherme ; la déshybridation est entretenue par une enzyme de restriction à la place de l'action de la chaleur.

6.1.1.5. Q-β amplification (Q-β replicase)

Une sonde complémentaire et spécifique de la séquence à amplifier est insérée dans un fragment d'ARN. La séquence cible fixée sur un support solide est hybridée avec la sonde. L'excès de sondes non fixées est éliminé par l'action d'une RNAse, puis l'ARN polymérase ARN-dépendante produite par le phage Q-β génère plusieurs millions de copies. Cette méthode isotherme (37 °C) brevetée n'est pas encore commercialisée pour le diagnostic de la tuberculose.

6.1.1.6. Autre méthode

La technique de SSCP (*single strand conformation PCR*) mettant en évidence une mutation sur une cible d'ADN (ADNr 16S) a été appliquée à l'identification de mycobactéries. Une différence de la conformation de l'ADN après amplification et dénaturation est mise en évidence par électrophorèse. Les espèces sont identifiées en comparant les migrations de l'ADN à celles de souches de référence. Un essai de détection des mycobactéries à partir d'échantillons cliniques a été récemment effectué sur un nombre restreint de prélèvements. Cette méthode paraît délicate à mettre en œuvre dans un laboratoire de routine.

6.1.2. Étapes pratiques au laboratoire

Les techniques de détection génomique après amplification sont réalisées sur des produits pathologiques décontaminés avec de la soude et de la N-acétyl-L-cystéine et concentrés afin d'augmenter la sensibilité de la technique.
Les étapes d'extraction des échantillons, d'amplification et de détection des produits amplifiés doivent respecter des procédures destinées à prévenir tout risque de contamination du personnel, de l'échantillon et de l'environnement jusqu'à l'étape d'extraction (manipulations sous poste sécurité microbiologique I ; voir chapitre 12 : Sécurité dans les laboratoires) afin de protéger les manipulateurs et de prévenir la survenue des résultats faussement positifs (contaminations croisées).

6.1.2.1. Extraction des acides nucléiques

L'étape d'extraction constitue une étape préalable indispensable à la détection de l'ADN des mycobactéries, bactéries dont la paroi présente des spécificités (épaisseur, composition). Des agents physiques (ultrasons, chauffage) et chimiques (SDS, triton X100) permettent une lyse de la paroi bactérienne. L'extrait brut ou purifié est ensuite utilisé pour l'amplification. Pour éliminer tout risque infectieux, l'échantillon est inactivé par la chaleur. L'extraction à partir de prélèvements est réalisée en observant des protocoles « maison ». Mais cette étape peut aussi être réalisée avec des résultats satisfaisants en utilisant des coffrets d'extraction adaptés à différents types de prélèvements (tissus, sang) qui incluent des microcolonnes de purification (Quiagen).

6.1.2.2. Détection des produits d'amplification

Les méthodes de détection des produits amplifiés sont variées et de plus en plus souvent automatisées. Les méthodes utilisées sont des techniques colorimétriques ou fluorimétriques. Certaines d'entre elles permettent une détection des produits quasiment en temps réel.

6.1.2.3. Organisation topographique dans les laboratoires

Les étapes d'extraction des échantillons d'amplification et de détection des produits amplifiés doivent respecter des procédures destinées à prévenir tout risque de contamination des échantillons, de l'environnement et du personnel jusqu'à l'étape d'extraction.
Quelques règles simples faciles à édicter mais parfois plus difficiles à mettre en œuvre permettent d'éviter la contamination par de l'ADN mycobactérien présent dans l'environnement. Il est recommandé d'individualiser trois zones de travail géographiquement distinctes, d'utiliser du matériel à usage unique et de changer régulièrement et chaque fois que c'est nécessaire de gants et de surblouse. Une zone où ne doit entrer aucun extrait d'ADN ou culture de mycobactéries est réservée à la préparation des réactifs d'amplification. L'extraction de l'ADN à amplifier et son dépôt dans le tube contenant les réactifs nécessaires à l'amplification sont réalisés dans un poste de sécurité microbiologique de type I ou II (deuxième endroit). L'amplification et la détection des produits d'amplification sont pratiquées dans un troisième lieu. Aucun retour en arrière des personnels, matériels et produits ne doit être effectué.

6.1.2.4. Contrôles de qualité

Une étude comparative réalisée en adressant à sept laboratoires différents des prélèvements contenant des concentrations bacillaires connues a montré de grandes variations de sensibilité (2 à 90 %) et de spécificité (3 à 77 %) d'un laboratoire à l'autre. Une autre étude réalisée auprès de 30 laboratoires dont 18 réalisaient ce diagnostic en routine avec des méthodes commerciales ou « maison » a montré que moins de 20 % des laboratoires avaient correctement identifié l'ensemble des 20 prélèvements (dix négatifs et dix positifs) et que plus de 50 % des laboratoires avaient déclaré au moins un faux positif.
Ces études posent la question de la standardisation des réactifs, y compris de ceux utilisés pour la décontamination et la concentration des prélèvements, et plaident en faveur de contrôles de qualité internes positifs et négatifs à chaque étape que comportent ces méthodes (homogénéisation-décontamination, extraction, amplification, détection).
L'utilisation d'un témoin interne préparé à partir d'un prélèvement négatif additionné d'un nombre faible, mais connu, de bacilles tuberculeux permettrait de détecter de faibles fluctuations dans la globalité de la méthode. La difficulté majeure repose sur la préparation du contrôle avec des bactéries qui ont tendance à se regrouper en amas. Ce contrôle global ne dispense pas d'utiliser des contrôles spécifiques pour chaque étape ; ADN purifiés pour les étapes d'amplification et de détection.
Dans chaque échantillon clinique, la recherche d'inhibiteurs peut être réalisée avec un ADN (contrôle interne) amplifié par le même couple d'amorces que celui utilisé dans le test. Une température d'hybridation plus basse du contrôle et un second système d'hybridation sont nécessaires. La prévention des contaminations par des amplicons provenant de réactions précédentes peut être réalisée par l'utilisation d'UDP ou d'UTP mais surtout par une séparation des lieux des différentes étapes techniques.

6.2. Performances des différentes méthodes

Au début des années 1990, l'installation de la technique de PCR dans les laboratoires le plus souvent hospitaliers a permis la publication de nombreux essais. L'apparition de coffrets commercialisés a aussi entraîné la publication de très nombreuses études.
Comme pour la comparaison des méthodes de culture, la comparaison des résultats de ces études est difficile pour des raisons d'échantillonnage (taux d'échantillons positifs élevé, pourcentage d'examen direct positif surévalué) et parfois de méthodologie (prise en compte des données microbiologiques seules ou associées à des éléments cliniques).
De nombreuses études comparatives évaluant la sensibilité, la spécificité, les valeurs prédictives positives et négatives des trousses commercialisées ont été publiées. L'analyse d'une revue non exhaustive de la littérature, regroupant plus de 21 000 prélèvements réalisés chez plus de 3 000 patients sur la recherche du génome de *Mycobacterium tuberculosis*, permet de tirer plusieurs enseignements (Tableaux 8.11) :
– la sensibilité des méthodes commercialisées d'amplification génomique n'est pas supérieure à celle de la culture ;

En pratique, les techniques de détection rapide par amplification ne remplacent pas les étapes classiques du diagnostic bactériologique et doivent être réservées aux prélèvements ayant un examen direct direct ou prélevé chez un patient fortement suspect de tuberculose.

7. Diagnostic immunologique rapide

7.1. Méthode directe

Depuis 20 ans, la détection directe d'antigènes solubles par latex ou même par technique Elisa à partir de produits pathologiques variés (sérum, liquide céphalorachidien, liquide pleural, prélèvement respiratoire, urine) a montré une sensibilité et une spécificité médiocres.

7.2. Sérologie

Les inconvénients du diagnostic bactériologique classique de la tuberculose (sensibilité et spécificité de l'examen direct, lenteur des cultures), ont conduit de très nombreux auteurs et ce, dès 1902, à mettre au point un sérodiagnostic. Les trois intérêts majeurs du sérodiagnostic de la tuberculose soulignés dans la plupart des études sont le diagnostic des formes extrapulmonaires, le diagnostic des formes infantiles de la maladie et la surveillance du traitement. Une très grande variété d'antigènes mycobactériens (protéiques, lipidiques) plus ou moins purifiés (extrait brut, filtrat, produit purifié) a été utilisée pour détecter des anticorps par technique Elisa principalement. Peu de coffrets ont été commercialisés comparativement aux nombreux essais de prototypes de trousses publiés.

Le développement de tests sérologiques dans le diagnostic de la tuberculose reste problématique du fait de la structure complexe des antigènes utilisés associant des sucres, des lipides et des protéines, qui conduit à des réactions croisées. Malgré la multitude des travaux réalisés, la réponse anticorps reste mal connue ; elle dépend notamment de la forme de présentation, du parcours de l'antigène et des interactions avec la réponse cellulaire. La purification des antigènes n'a pas conduit à des améliorations majeures excepté pour certains antigènes lipidiques. Différents obstacles rencontrés tiennent à la fréquence des contacts avec des mycobactéries commensales (spécificité) et au manque de corrélation entre l'intensité de la réponse anticorps et l'étendue et le caractère chronique de la maladie (sensibilité).

Les caractéristiques des tests, l'absence de standardisation et de commercialisation (un seul test commercialisé en France) associées à un coût élevé ne laissent qu'une place très limitée à l'utilisation des tests sérologiques dans le diagnostic et la surveillance du traitement de la tuberculose. Toutefois, dans un travail récent, l'association de deux antigènes glycolipidiques spécifiques de *M. tuberculosis* (DAT, PGLTb1) a montré une sensibilité de 76 %. On peut espérer que le séquençage complet du génome de différentes souches du complexe *tuberculosis* et les progrès obtenus dans le domaine de la protéomique des mycobactéries permettront de mieux cerner des épitopes spécifiques d'une réponse anticorps précoce.

La seule épreuve immunologique utilisée en routine pour détecter une éventuelle tuberculose évolutive est l'intradermoréaction (IDR) (qui n'est pas réalisée au laboratoire).

8. Conclusion

Le diagnostic des mycobactérioses est un diagnostic bactériologique qui repose toujours sur la mise en évidence des mycobactéries par culture (méthode de référence). Le couplage d'une méthode de culture optimisée et d'une méthode d'identification rapide permet de diminuer de manière significative le délai de réponse au clinicien. Les méthodes d'amplification génomique doivent être réservées actuellement pour des prélèvements sélectionnés sur des critères biologiques (examen direct positif) ou cliniques (forte suspicion de tuberculose) et radiologiques (images évocatrices). Les progrès dans l'identification et la détection avec les futures techniques de biologie moléculaire (puces à ADN, microarrays) ne seront vraiment probants qu'après avoir obtenu une amélioration sensible des méthodes d'extraction et de la neutralisation des inhibiteurs des systèmes d'amplification.
Les avantages de la rapidité du diagnostic sont multiples :
– attente par l'équipe clinique des résultats sans mise au traitement d'épreuve ;
– diminution du nombre d'explorations à visée diagnostique ;
– isolement plus rapide des patients bacillifères ;
– évaluation et surveillance plus aisée de la sensibilité des mycobactéries aux antibiotiques.
L'amélioration apportée par ces méthodes dans la prise en charge globale des patients (hospitalisation raccourcie, explorations moins nombreuses, traitement approprié, moindre coût) reste cependant à évaluer et susceptible d'évoluer dans le futur.

Pour en savoir plus

American thoracic society. Rapid diagnostic test for tuberculosis : what is the appropriate use ? Am J Respir Crit Care 1987 ; 155 : 1804-14.

Bahammam A, Choudhri S, Long R. The validity of acid-fast smears of gastric aspirates as an indicator of tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis 1999 ; 3 : 62-7.

Blackwood KS, He C, Gunton J, Turenne CY, Wolfe J, Kabani AM. Evaluation of *recA* sequences for identification of *Mycobacterium* species. J Clin Microbiol 2000 ; 38 : 2842-52.

Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc Natl Acad Sci USA 2002 ; 99 : 3684-9.

Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr. Clinical and taxonomic status of pathogenic non-pigmented or late-pigmented rapidly growing mycobacteria. Clin Microbiol Rev 2002 ; 15 : 716-46.

Carbonnelle B, Dailloux M, Lebrun L, Mangein J, Pernot C. Mycobactéries, mycobactérioses. Cahier de formation biologie médicale. Bioforma (Paris) ; 2003 ; 29 : 1-157.

Cernoch PL, Enns RK, Saubolle MA, Wallace RJ Jr. Laboratory diagnosis of the mycobacterioses. In : Weissfeld AS, Ed. Washington DC : ASM Press ; 1994. Cumitech 16A.

Choudhry V, Saxena RK. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* antigens in urinary proteins of tuberculosis patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002 ; 21 : 1-5.

Chan ED, Heifets L, Iseman MD. Immunologic diagnosis ot tuberculosis : a review. Tuber Lung Dis 2000 ; 80 : 131-40.

Cohen R, Muzaffar, Schwartz D, Bachir S, Luke S, Mc Gartland LP, et al. Diagnosis of pulmonary tuberculosis using PCR assays on sputum collected within 24 hours of hospital admission. Am J Crit Care Med 1998 ; 157 : 156-61.

Collins CH, Grange JM, Yates MD. Tuberculosis bacteriology. Organisation and practice. 2nd Ed. Butterwort-Heinemann, Oxford, Boston, Johannesburg, Melbourne, New Delhi, Singapore, 1997.

Craft DW, Jones MC, Blanxhet CN, Hopfer RL. Value of examining three acid-fast bacillus sputum smears for removal of patients suspected of having tuberculosis from the « Airborne precautions » category. J Clin Microbiol 2000 ; 38 : 4285-7.

David H, Levy-Frebault V, Thorel MF. Méthodes de laboratoire pour mycobactériologie clinique. Paris : Institut Pasteur ; 1989.

Devallois A, Rastogi N. L'apport des méthodes moléculaires pour le diagnostic rapide des infections à mycobactéries. Pathol Biol 1998 ; 46 : 638-50.

Grosset J, Boisvert H, Truffot-Pernot C. Mycobactéries. In : Le Minor L, Véron M, Eds. Bactériologie médicale. Paris : Flammarion Médecine-Sciences ; 1989. p. 965-1017.

Harboe M, Nagai S, Patarroyo ME, Torres ML, Ramirez C, Cruz N. Properties of proteins MPB64, MPB70 and MPB80 of *Mycobacterium bovis* BCG. Infect Immun 1986 ; 52 : 293-302.

Hasegawa N, Miura T, Ishii K, Yamaguchi K, Linder TH, Meritt S, et al. New simple and rapid test for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex : a multicenter study. J Clin Microbiol 2002 ; 40 : 908-12.

Hellyer TJ, DesJardin LE, Hehman GL, Cave MD, Eisenach KD. Quantitative analysis of mRNA as a marker for viability of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 290-95.

Imaeda T. Deoxyribonucleotic acid relatedness among species strains of *Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis, Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium microti* and *Mycobacterium africanum*. Int J Syst Bacteriol 1985 ; 35 : 147-50.

Jouveshomme S, Cambau E. Place de l'amplification génique dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire. Antibiotiques 2002 ; 3 : 173-80.

Kasai H, Ezaki T, Harayama S. Differenciation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyr*B sequence multiple. J Clin Microbiol 2000 ; 38 : 301-8.

Kaul K, Luke S, Mc Gurn CM, Snowden N, Monti C, Fry WA. Amplification of residual DNA sequence in sterile bronchoscope leading to false-positive PCR results. J Clin Microbiol 1996 ; 34 : 1949-51.

Kim BJ, Lee SH, Lyu MA, KimGH, Bai GH, Chae GT, et al. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase (*rpoB*). J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 1714-20.

Kraus G, Cleary T, Miller N, Seivright R, Young AK, Spruill GM, et al. Rapid and specific detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using fluorogenic probes and real-time PCR. Mol Cell Probes 2001 ; 15 : 375-83.

Lachnick J, Ackermann B, Bohrsen A, Maass S, Diephaus C, Puncken A, et al. Rapid-cycle PCR and fluorimetry for detection of mycobacteria. J Clin Microbiol 2002 ; 40 : 3364-73.

Lappayawichit P, Rienthong S, Tienthong D, Chuchottaworn C, Chaiprasert A, Pan Bangred W, et al. Differenciation of *Mycobacterium* species by restriction enzyme analysis of amplified 16S-23S ribosomal DNA spacer sequences. Tuber Lung Dis 2000 ; 77 : 257-63.

Mäkinen J, Sarkola A, Marjamäki M, Viljanen MK, Soini H. Evaluation of GenoType and LiPA mycobacteria assays for identification of Finnish mycobacterial isolates. J Clin Microbiol 2002 ; 40 : 3478-81.

Metchock BG, Nolte FS, Wallace RJ Jr. *Mycobacterium*. In : Murray PR, Jo Baron H, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH, Eds. Manual of clinical microbiology. Washington, DC : ASM Press ; 1999. p. 399-437.

Nelson SM, Deike MA, Cartwright CP. Value of examining multiple specimen in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. J Clin Microbiol 1998 ; 36 : 467-9.

Niemann S, Harmsen D, Rüsch-Gerdes S, Richter E. Differenciation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyr*B DNA sequence polymorphism analysis. J Clin Microbiol 2000 ; 38 : 3231-4.

Noordhoek GT, van Embden JDA, Kolk AHJ. Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis* : an international collaborative quality control study among 30 laboratories. J Clin Microbiol 1996 ; 34 : 2522-5.

Noordhoek GT, Kolk AHJ, Bjune G, Catty D, Dale JW, Fine PE, et al. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* : a blind comparison among seven laboratories. J Clin Microbiol 1994 ; 32 : 277-84.

Park H, Jang H, Kim C, Chung B, Chang CL, Park SK, et al. Detection and identification of mycobacteria by amplification of the CR primers. J Clin Microbiol 2000 ; 38 : 4080-5.

Ringuet HC, Akoua-Koffi S, Honore A, Varnerot A, Vincent V, Berche P, et al. *hsp65* sequencing of rapidly growing mycobacteria. J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 852-7.

Robert GD, Hall L, Wolk DM. Mycobacteria. In : Truant AL, Ed. Commercial methods in clinical microbiology. Washington, DC : ASM Press ; 2002. p. 256-73.

Roth A, Reischl U, Streubel A, Nauman L, Kroppenstedt RN, Habcht M, et al. Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus-specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases. J Clin Microbiol 2000 ; 38 : 1094-105.

Shinninck TM, Good RC. Diagnostic mycobacteriology laboratory practices. Clin Infect Dis 1995 ; 21 : 291-9.

Shinninck TM, Good RC. Mycobacterial taxonomy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994 ; 13 : 884-901.

Siddiqui AH, Perl TM, Conlon M, Donegan N, Roghmann MC. Preventing nosocomial transmission of pulmonary tuberculosis : when may isolation be discontinued for patients with suspected tuberculosis ? Infect Control Hosp Epidemiol 2002 ; 23 : 141-4.

Steingrube VA, Bibson JL, Brown BA, Zhang Y, Wilson RW, Rajagopalan M, et al. PCR amplification and restriction endonuclease analysis of a 65-Kilo Dalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. J Clin Microbiol 1995 ; 33 : 149-53.

Thierry D, Baugé S, Poveda JD, Vincent V, Guesdon JL. Rapid identification of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex strain ; clinical practice evaluation of DT6 and DT1 probes. J Infect Dis 1993 ; 168 : 1337-8.

Telentini A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger E, Bodmer T. Rapid identification to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol 1993 ; 31 : 175-8.

Tortoli E, Nanetti A, Piersimoni, Cichero P, Farina C, Mucignat G, et al. Performance assessment of new multiplex probe assay for identification of mycobacteria. J Clin Microbiol 2001 ; 31 : 1079-84.

Vincent Levy-Frebault V, Portaels VF. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for discrimination of new slowly growing *Mycobacterium* species. Int J Syst Bacteriol 1992 ; 42 : 315-23.

Waleria-Aleixo A, Kroon EG, Campos AS, Margutti-Pinto ME, Bonjardim CA, Ferreira PCP. Heteroduplex mobility assay for rapid, sensitive and specific detection of mycobacteria. Diag Microbiol Infect Dis ; 2000 ; 89 : 225-35.

Walter GT, Little MC, Nadeau JG, Shank DD. Isothermal in vitro amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA/polymerase system. Proc Natl Acad Sci 1992 ; 89 : 392-6.

Annexes

Homogénéisation et décontamination

Méthode de Petroff (modifiée)
Réactifs
Solution décontaminante stérile (soude à 4 %)
- Soude pure en pastilles 10 g
- Eau distillée q.s.p. 1 000 ml
- Stérilisation à l'autoclave

Solution de neutralisation
- Acide sulfurique à 4 %
- Solution aqueuse de Bleu de tournesol

Technique
- Déposer le prélèvement dans un tube à centrifuger de 50 ml
- Ajouter un volume égal de solution de soude puis agiter
- Mettre le tube à l'étuve à 37 °C jusqu'à homogénéisation (20 à 30 min au plus)
- Neutraliser
- Centrifuger à 2 000 *g* (3 000 rpm) pendant 20 min
- Décanter le liquide surnageant
- Sur chaque milieu de culture : ensemencer 2–3 gouttes du culot neutralisé

Méthode au Lauryl-sulfate de sodium

Réactifs
Solution décontaminante
- Lauryl-sulfate de sodium pur 30 g
- Soude pure en pastilles 10 g
- Eau distillée q.s.p. 1 000 ml
- Répartir par flacon de 30 ml et stériliser à l'autoclave

Solution de neutralisation
- Pourpre de Bromocrésol (1/250) 2 ml
- Acide phosphorique pur 1,5 ml
- Eau distillée q.s.p. 1 000 ml
- Répartir par flacon de 30 ml et stériliser à l'autoclave

Technique
- Mettre le crachat dans un tube à centrifuger à vis de 50 ml
- Ajouter 3ml de la solution décontaminante à 2 ml de produit pathologique
- Agiter une demi-heure sur agitateur de Kahn (30 min)
- Verser 30 ml de solution de neutralisation (retour au jaune)
- Centrifuger à 2 000 *g* (3 000 rpm) pendant 20 min
- Décanter le liquide surnageant
- Sur chaque milieu de culture : ensemencer 2–3 gouttes du culot neutralisé

Méthode de Kubica à l'acétylcystéine et soude

Réactifs
Solution décontaminante
- Citrate de sodium ($3H_2O$) 2,94 g

– Eau distillée q.s.p. 100 ml
– Soude pure en pastilles 10 g
– Eau distillée q.s.p. 1 000 ml
– Mélanger extemporanément 50 ml de chacune des solutions autoclavées et ajouter 0,5 g de N-acétyl-L-cystéine (NALC)

Solution de neutralisation (tampon phosphate pH 6,8)
– Solution A
– Phosphate disodique 9,47 g
– Eau distillée q.s.p. 100 ml
– Solution B
– Phosphate monopotassique 9,08 g
– Eau distillée q.s.p. 1 000 ml
– Mélanger 50 ml de chacune des solutions puis autoclaver

Solution stérile d'albumine bovine (fraction V : 0,2 %)

Technique
– Déposer le prélèvement dans un tube à centrifuger de 50 ml
– Ajouter un volume égal du réactif NALC-NaOH
– Agiter au vortex 30 secondes au maximum
– Agiter 20 à 30 min sur un agitateur de Kahn (20–25 °C)
– Remplir à le tube avec le tampon phosphate stérile
– Centrifuger 30 min à 3 000 *g*
– Décanter le surnageant dans un récipient
– Sur chaque milieu de culture : ensemencer 2–3 gouttes du culot neutralisé

La solution d'albumine bovine permet de re-suspendre le culot. Cette pratique n'est pas recommandée pour ensemencer les flacons Bactec 12B.

Méthodes de coloration – Examens microscopiques

Méthode de Ziehl-Neelsen modifiée selon IUTC

Réactifs

Solution alcoolique saturée de Fuchsine
– Fuchsine basique 0,3 g
– Éthanol à 95° 10 ml

Solution aqueuse de phénol
– Phénol (cristaux) 5 g
– Eau distillée 90 ml
– Faire fondre à 95 °C (bain-marie) puis ajouter l'eau

Solution de travail
– Mélanger les deux solutions (fuchsine et phénol)

Solution de décoloration
– Acide sulfurique à 25 % (v/v)
– Solution de contre-coloration
– Bleu de méthylène hydrosoluble (ou chlorure) 0,3 g
– Eau distillée q.s.p. 100 ml

Technique
– Couvrir le frottis de fuchsine phéniquée
– Chauffer très doucement jusqu'à émission de vapeur
– Le colorant doit agir 5 min sans ébullition ni dessèchement
– Rincer la lame à l'eau stérile

– Couvrir le frottis d'acide sulfurique à 25 %, 3 min
– Rincer la lame à l'eau stérile
– Couvrir le frottis avec la solution de bleu de méthylène, 2 min
– Rincer la lame à l'eau stérile et laisser sécher à l'air

Coloration à foid (Kinyoun modifiée)

Réactifs
Solution alcoolique saturée de Fuchsine
– Fuchsine basique 4 g
– Méthanol 20 ml
Solution aqueuse de phénol
– Phénol à 8 % 100 ml
Solution de travail
– Mélanger les deux solutions (fuchsine et phénol)
Solution de décoloration
– Acide chlorhydrique 30 ml
– Éthanol à 95° 970 ml
Solution de contre-coloration :
– Bleu de méthylène hydrosoluble (ou chlorure) 0,3 g
– Eau distillée q.s.p. 100 ml
Technique
– Couvrir le frottis de fuchsine phéniquée 5 min sans chauffer
– Rincer la lame à l'eau stérile
– Couvrir le frottis du mélange acide-alcool pendant 3 min
– Rincer la lame à l'eau stérile
– Couvrir le frottis avec la solution de bleu de méthylène 2 min
– Rincer la lame à l'eau stérile et laisser sécher à l'air

Méthode à l'auramine (méthode de Degommier)

Réactifs
Solution auramine
– Auramine O 1 g
– Eau distillée 500 ml
Solution de phénol aqueux
– Phénol (cristaux) 1 kg
– Eau distillée 100 ml
– Faire fondre à 95 °C (bain-marie) puis ajouter l'eau
– Conserver à +4 °C
Solution de travail
– Chlorure de magnésium 2 g
– Phénol aqueux 50 ml
– Eau distillée 500 ml
– Solution d'auramine 500 ml
– Mélanger puis filtrer (conserver à +4 °C)
Solution de décoloration
– Chlorure de sodium 5 g
– Éthanol à 95° 1 000 ml
– Acide chlorhydrique 5 ml
– Solution de contre-coloration

– Rouge de thiazine (solution aqueuse à 0,1 %) 1 g
– Phénol aqueux 50 ml
– Chlorure de magnésium (solution aqueuse à 1 %) 2 g
– Eau distillée q.s.p. 1 000 ml

Technique

– Rincer la lame à l'eau stérile
– Couvrir avec la solution d'auramine 20 min
– Rincer la lame à l'eau stérile
– Couvrir avec le mélange acide-alcool 3 min
– Rincer la lame à l'eau stérile
– Couvrir avec la solution de rouge de thiazine, 1 min 30 s
– Rincer la lame à l'eau stérile et laisser sécher à l'air

Méthode à l'auramine (méthode de Smithwick)

Réactifs

Solution auramine
– Auramine O 0,1 g
– Éthanol 95° 10 ml

Solution de travail
– Phénol à 3 % 100 ml
– Mélanger les deux solutions (auramine et phénol)

Solution de décoloration
– Éthanol à 70° 100 ml
– Acide chlorhydrique 0,5 ml

Solution de contre-coloration
– Rouge de thiazine 0,1 g
– Phosphate disodique à 0,1 % 100 ml

Technique

– Rincer la lame à l'eau stérile
– Couvrir avec la solution d'auramine 15 min
– Rincer la lame à l'eau stérile
– Couvrir avec le mélange acide-alcool 2 min
– Rincer la lame à l'eau stérile
– Couvrir avec la solution de rouge de thiazine, 2 min
– Rincer la lame à l'eau stérile et laisser sécher à l'air

Liste des fournisseurs

Abbott laboratories
12, rue de la Couture Silic 203
94518 Rungis cedex
Tél : 01 45 60 25 00
Fax : 01 45 60 04 98
Site internet : www.abbott.com

Becton Dickinson
11, rue Aristide-Bergès
38800 Le Pont-de-Claix
Tél : 04 76 68 37 30
Fax : 04 76 68 35 04
Site internet : www.bd.com

bioMérieux
Chemin de l'Orme
69280 Marcy l'Étoile
Tél : 04 78 87 20 00
Fax : 04 78 37 20 90
Site internet : www.biomerieux.com

Bio-Rad Laboratories
3, boulevard Raymond-Poincaré
92430 Marnes la Coquette
Tél : 01 47 95 60 00
Fax : 01 47 41 91 33
Site internet : www.bio-rad.com

Dako S.A
2, rue Albert-Einstein, BP 149
78196 Trappes cedex
Tél : 01 30 50 00 50
Fax : 01 30 50 00 11
Site internet : www.dakocytomation.com

Qiagen S.A.
3, avenue du Canada, LP 809
91974 Courtabœuf cedex
Tél : 01 60 92 09 20
Fax : 01 60 92 09 25
Site internet : www.qiagen.com

Roche Diagnostic
2, avenue du Vercors
38242 Meylan cedex
Tél : 04 76 76 30 30
Fax : 04 76 76 30 01
Site internet : www.roche-diagnostics.fr

Innogenetics
8, rue du Maréchal-de-Lattre-de-Tassigny
59800 Lille
Tél : 01 64 59 14 54
Site internet : www.innogenetics.com

HAIN Diagnostika
72147 Nehren, Allemagne
distribué par Biocentric
270, rue Jenner
83150 Bandol, France
Tél : 04 94 63 46 46
Fax : 04 94 63 46 47
Site internet : www.biocentric.com

Heipha Diagnostika/Biotest
80, rue Hélène-Boucher
Z.I. Centre
78530 Buc
Tél : 01 39 20 20 80
Fax : 01 39 20 20 81
Site internet : www.sfrl.fr

Mycobacterium tuberculosis et mycobactéries atypiques

Chapitre 9

Épidémiologie moléculaire de *Mycobacterium tuberculosis*

Véronique Vincent, M.-Cristina Gutierrez

Méthodes de typage moléculaire des bacilles de la tuberculose

Applications de ces méthodes

Avant le développement de la biologie moléculaire, la lysotypie (c'est-à-dire la sensibilité des souches à différents phages) était la seule méthode de typage de *M. tuberculosis*, mais se révélait peu discriminante et mal standardisée. Avec la description de la séquence répétée IS*6110* et la standardisation de la méthode dite de détermination du polymorphisme de longueurs des fragments de restriction (RFLP) utilisant cet élément comme sonde, le typage de *M. tuberculosis* s'est rapidement répandu et d'autres marqueurs sont venus compléter ces outils épidémiologiques. Ces méthodes s'appuient sur le principe que les patients infectés avec des souches à profil génomique identique sont épidémiologiquement liés alors que ceux infectés avec des souches à profil distinct ne le sont pas. La validité de cette hypothèse dépend des propriétés des marqueurs génomiques utilisés qui doivent être suffisamment polymorphes pour distinguer des souches différentes, mais suffisamment stables pour identifier les différents isolements d'une même souche.

1. Méthodes de typage moléculaire des bacilles de la tuberculose

1.1. Méthode de référence RFLP IS*6110*

L'élément IS*6110* est une séquence d'insertion spécifique des bacilles de la tuberculose et absent des autres espèces mycobactériennes. Chez *M. tuberculosis*, la distribution d'IS*6110* varie d'une souche à l'autre avec un nombre de copies variable et des localisations différentes sur le chromosome. Ce polymorphisme est le résultat de transpositions ou de divers événements génétiques successifs survenus au cours de l'évolution.

Un protocole standardisé a été proposé pour la méthode RFLP IS*6110*. La technique consiste à digérer le génome par *Pvu*II, une enzyme de restriction qui ne coupe qu'une fois dans IS*6110*, puis à séparer les fragments par électrophorèse en gel d'agarose. Par hybridation avec la séquence répétée IS*6110*, on révèle le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) des quelques fragments d'ADN qui portent IS*6110* (Fig. 9.1 et 9.2). On génère ainsi des profils génomiques caractéristiques (Fig. 9.3), facilement comparables, différents pour des souches isolées de patients sans lien épidémiologique. Cependant, la comparaison d'un grand nombre de profils réalisés sur différents gels d'électrophorèse nécessite des logiciels sophistiqués d'analyse d'images et la formation d'utilisateurs avertis. Il est important de vérifier visuellement que les systèmes identifient correctement toutes les bandes de chaque profil sans l'introduction de défauts (doubles bandes mal reconnues, décalage de bandes...). De plus, il est crucial de vérifier les résultats obtenus dans les régions reconnues homologues par les logiciels. En aucun cas, l'interprétation réalisée par le logiciel ne doit être considérée comme définitive sans que l'utilisateur n'ait considéré l'éventualité de tels écueils.

Les profils sont stables au cours du temps, un atout majeur et indispensable pour définir la technique RFLP IS*6110* comme un bon outil épidémiologique. Ce critère est particulièrement important puisque, dans le contexte de tuberculose, les diagnostics sont parfois distants de plusieurs mois. Chez un même patient, ou chez les patients d'un même groupe de transmission, les profils des

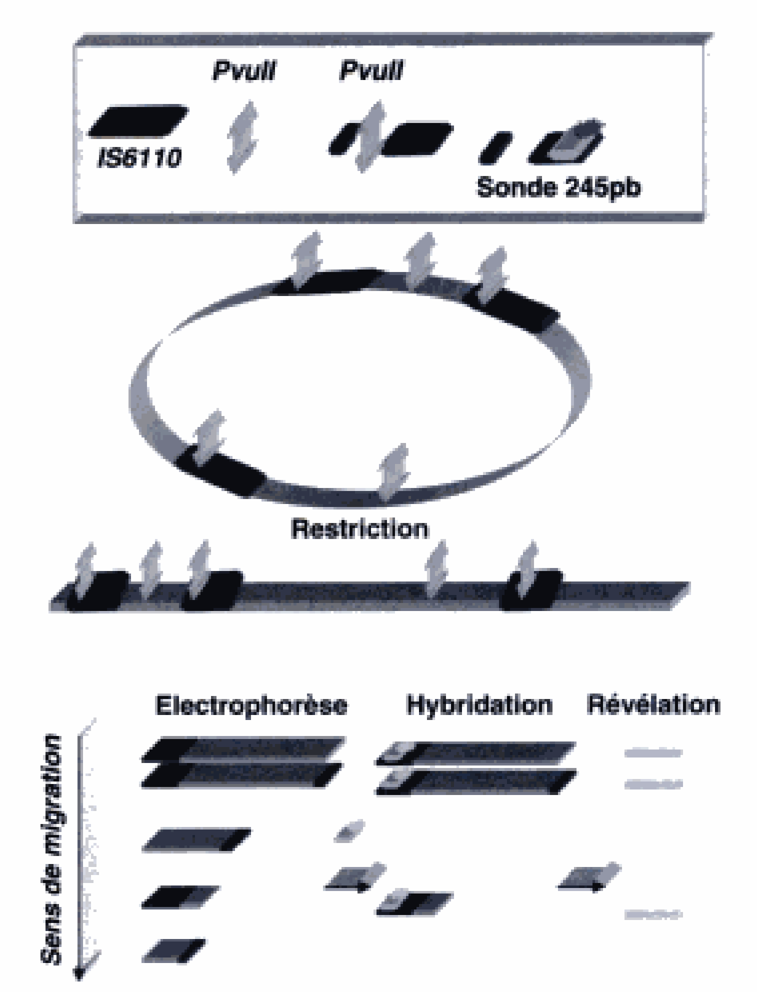


Figure 9.1. Principe de la méthode d'étude du polymorphisme de restriction après hybridation (RFLP) avec la sonde IS*6110*.

souches isolées varient peu, mais on observe parfois des variations correspondant au gain ou à la perte d'une ou deux copies d'IS*6110*. Une étude menée aux Pays-Bas portant sur des isolements séquentiels obtenus à partir de patients a montré une demi-vie de RFLP IS*6110* de trois à quatre ans. Le taux de transposition serait stimulé dans un environnement micro-aérobie, caractéristique des bacilles en dormance. Ce phénomène contribuerait à expliquer les variations de profils génomiques plus fréquemment retrouvées sur les souches de patients contaminés au sein d'une même chaîne de transmission évoluant sur plusieurs années. Les changements de profils de résistance aux antituberculeux sont sans incidence sur le profil génomique.

Le séquençage du génome de la souche H37Rv de *M. tuberculosis* a montré que la plupart des copies d'IS*6110* sont insérées dans des régions intergéniques ou non codantes, souvent près des gènes ARNt, ce qui contribue à prévenir l'inactivation des gènes et explique la diversité des possibilités d'insertion de l'élément. Cependant, la distribution de IS*6110* n'est pas uniforme sur l'ensemble du génome. Les insertions sont rares dans le quart du génome encadrant le gène *oriC* et très fréquentes dans une autre région spécifique des bacilles de la tuberculose, la région dite « DR ». On peut avancer l'hypothèse qu'à l'origine le bacille tuberculeux ne possédait qu'une seule copie de

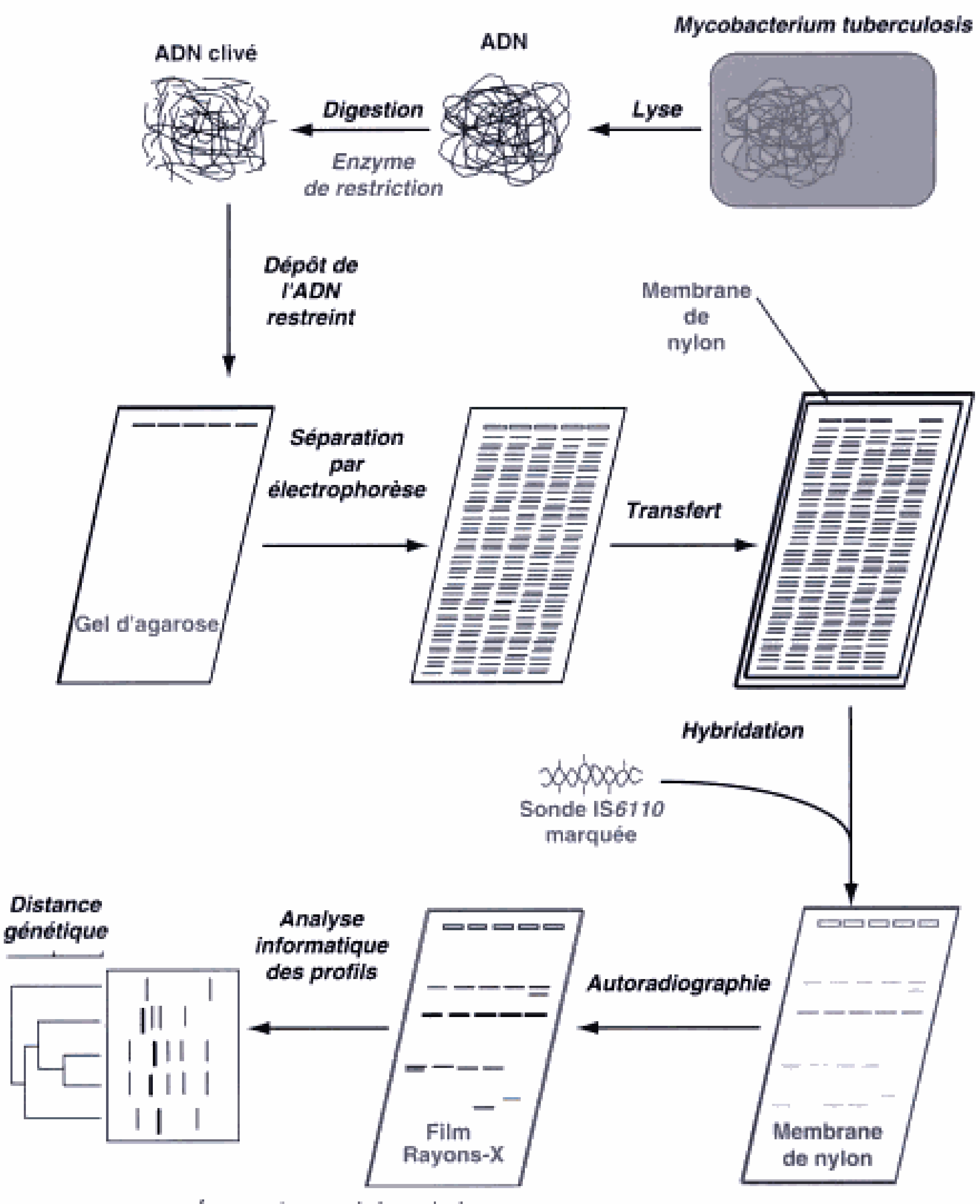


Figure 9.2. Étapes techniques de la méthode RFLP-IS*6110*.

IS*6110* localisée dans la région DR et que cette copie s'est, par la suite, transposée de proche en proche. Cette limite au polymorphisme potentiel de la distribution des IS*6110* dans le chromosome et l'isolement de souches à faible nombre de copies, voire de souches dépourvues de tout élément IS*6110*, souches dont la fréquence varie fortement selon les régions géographiques, indiquent la nécessité de disposer d'autres marqueurs moléculaires pour assurer la discrimination efficace d'un grand nombre de souches.

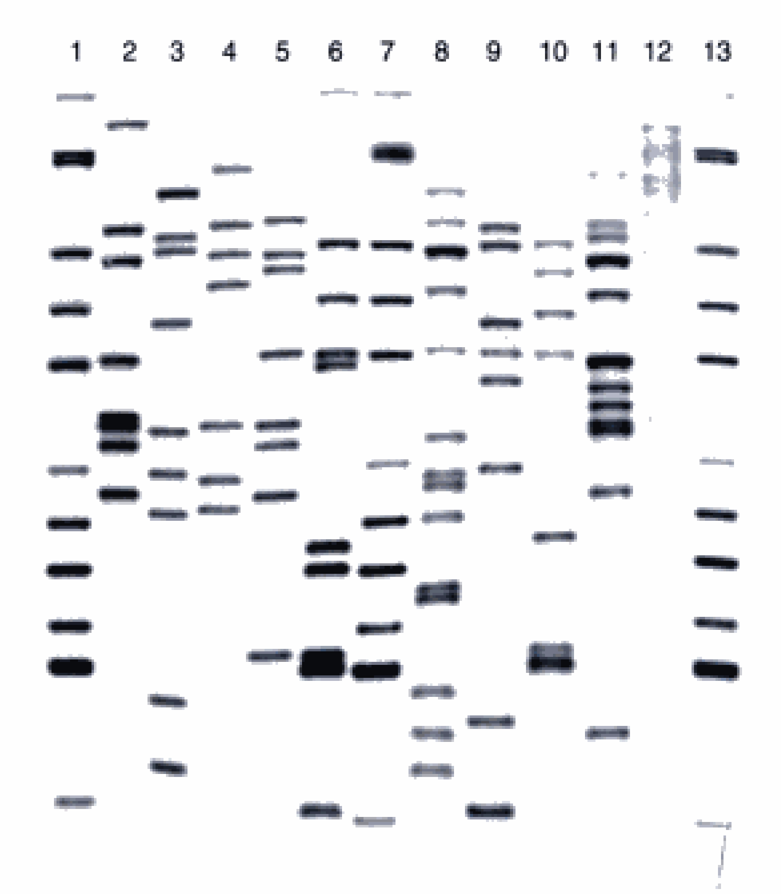


Figure 9.3. Profils génomiques de souches de *M. tuberculosis* par la méthode de référence RFLP IS*6110*. Les puits 1, 7 et 13 correspondent à la souche témoin Mt14323. Les autres puits correspondent à des souches isolées de patients sans lien épidémiologique. Le puits 12 souligne la difficulté de réalisation de la méthode avec un profil ininterprétable à partir d'un ADN moins riche que ceux de la même série.

1.2. Méthodes par PCR (*polymerase chain reaction*)

La méthode RFLP est lourde, lente, car elle nécessite plusieurs milligrammes de culture mycobactérienne et, de plus, sa réalisation technique (extraction de l'ADN, purification, digestion, électrophorèse, transfert sur membrane, hybridation, révélation) s'effectue sur une dizaine de jours. Les méthodes de typage récentes qui bénéficient de la rapidité des techniques d'amplification génique permettent l'obtention de résultats en 48 h à partir de quelques colonies ou de culture en milieu liquide.

1.2.1. Spoligotyping

La méthode dite « spoligotyping » repose sur la détection du polymorphisme dans la région DR (*direct repeat*), une région unique qui contient des répétitions directes de 36 pb séparées par des séquences variables de 35 à 41 pb. Ces séquences varient d'une souche à l'autre par leur longueur, leur séquence et leur nombre. Pour la réalisation de la méthode, la région DR est amplifiée grâce à deux amorces extérieures à partir d'un lysat cellulaire utilisé comme

Souche	Spoligotype 1 9 19 29 39 43	Ref
M. tuberculosis H37Rv	■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□■■■■■■■■■■■■□□□□■■■■■■■	[10]
M. bovis BCG Pasteur	■■□■■■■■□■■■■■■□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□□□□□	[10]
M. tuberculosis Beijing or W	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■■■■■■■■	[26]
M. africanum		[24]
type A1	■■■■■■□□□■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■■□■■■■	
type A2	■■■■■■■□□□□□■■■■■■■■□□□□■■■■■■■■■■■■□□□■■■■	
M. canettii	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■□□□□□■□□□□□□□	[22]
M. microti	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□■■□□□□□	[23]

■ Hybridation positive ; □ absence d'hybridation.

Figure 9.4. Profils génomiques en *spoligotyping* de quelques membres du complexe des bacilles de la tuberculose.

Le nombre de copies MIRU des différents loci est stable dans le temps, ce qui permet un suivi fiable des patients chroniques sur de longues périodes. Les profils MIRU identiques identifiés chez des souches d'un même patient, isolées jusqu'à six ans d'intervalle, mais à profils RFLP IS*6110* différents, montre que le taux d'évolution des 12 loci MIRU est un peu plus lent que celui de IS*6110*. La méthode est plus performante que la méthode de référence RFLP IS*6110* car elle permet de typer toutes les souches, y compris celles dépourvues ou à faible nombre de copies de IS*6110*. Sur les souches bien différenciées par la méthode de référence, l'analyse par MIRU est comparable à celle de RFLP IS*6110*, ce qui fait de cette méthode la plus performante des méthodes de typage moléculaire de *M. tuberculosis*.

2. Applications de ces méthodes

2.1. Identification des souches de bacilles de la tuberculose

Le typage moléculaire, en particulier le *spoligotyping*, se révèle un remarquable marqueur taxonomique d'identification. L'identification phénotypique permet de reconnaître facilement la plupart des souches de *M. tuberculosis* d'après la morphologie des colonies, la croissance sur TCH, et des tests niacine

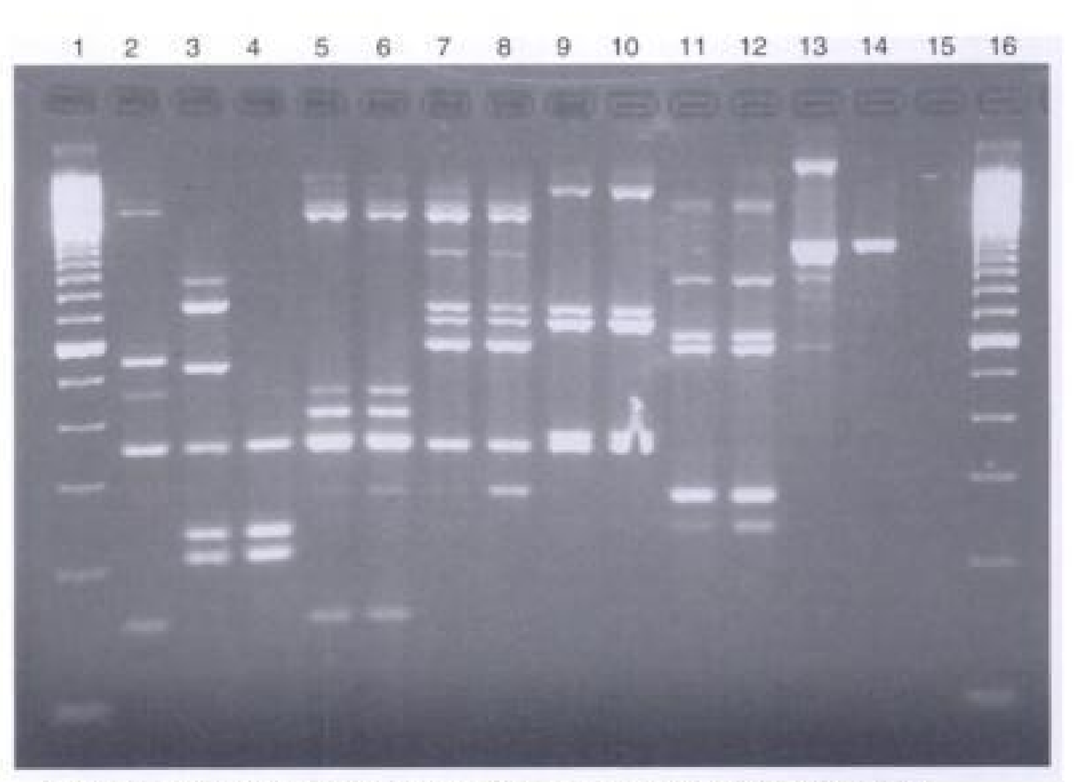


Figure 9.5. Profils génomiques de souches de *M. tuberculosis* par la méthode LM-PCR.
Les puits 1 et 16 correspondent au marqueur de poids moléculaire. Les puits 5 et 6, 7 et 8, 9 et 10, 11 et 12 correspondent à des couples de souches identiques isolées de patients différents. Les autres puits correspondent à des souches isolées de patients sans lien épidémiologique. Le puits 15 correspond à un témoin d'amplification négative.

et nitrate réductase positifs, alors que *M. bovis* est caractérisé par un phénotype opposé. Cependant, certaines souches authentiques de *M. tuberculosis* présentent des phénotypes intermédiaires difficiles à identifier et les souches de *M. africanum* apparaissent systématiquement comme intermédiaires entre les phénotypes de *M. bovis* et *M. tuberculosis* avec de nombreuses variations possibles. Les souches de *M. microti*, agent de la tuberculose murine rarement rencontré en clinique, sont particulièrement difficiles à cultiver, ce qui constitue un obstacle à leur étude phénotypique. Le *spoligotyping* contribue à clarifier l'identification des différents bacilles de la tuberculose et l'on reconnaît des profils caractéristiques de *M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum*, et *M. microti*. Les souches de *M. tuberculosis* sont caractérisées par l'absence des oligonucléotides 33–36, *M. bovis* par l'absence des oligonucléotides 39–43, 3, 9 et 16, et *M. microti* par la présence des seuls oligonucléotides 37 et 38 (parfois accompagnés d'oligonucléotides de numérotation inférieure à 25). On reconnaît deux types A1 et A2 chez *M. africanum* qui ont en commun l'absence des oligonucléotides 8, 9 et 39. Les souches de *M. canettii*, nouvelle espèce des bacilles de la tuberculose à colonies lisses, génèrent un profil caractéristique en *spoligotyping* avec la présence de seulement deux oligonucléotides (29 et 36). De plus, le *spoligotyping* facilite la reconnaissance de familles de souches clonales dont la famille Beijing, caractéristique de souches de *M. tuberculosis* prévalentes en Russie et en Asie du Sud-Est et retrouvées dans toutes les régions du monde. Ces souches présentent toutes le même profil en *spoligotyping* avec la présence de neuf oligonucléotides adjacents (35 à 43). Dans certains pays (États-Unis, Estonie, Vietnam), la famille Beijing est fortement associée à la résistance des souches aux antituberculeux, mais cette corrélation n'est pas retrouvée dans tous les pays où la famille est prévalente. En l'absence de données exhaustives, l'ubiquité des souches Beijing et leur fréquente association à des épidémies et à la résistance aux antibiotiques soulignent leur importance épidémiologique. Une corrélation entre génotype Beijing et réponse fébrile au cours du traitement antituberculeux a été mise en évidence, suggérant une réponse immunitaire particulière. Le succès de l'expansion de la famille Beijing pourrait être lié à une capacité améliorée de réplication dans les macrophages. La souche W, responsable d'une épidémie de tuberculose multirésistante aux États-Unis, impliquant plus de 500 cas, appartient à la famille Beijing.

2.2. Utilisations épidémiologiques du typage moléculaire

Le typage de *M. tuberculosis* avec des méthodes fiables et discriminantes permettant de repérer des isolements d'une même souche a de nombreuses applications. On peut ainsi déterminer des groupes de cas de transmission récente, établir le tracé d'épidémies dues à des bacilles sensibles ou résistants, déterminer la nature nosocomiale de l'épidémie, distinguer réinfection et rechute. Le typage s'est aussi révélé pertinent pour identifier des contaminations conduisant à des diagnostics bactériologiques de tuberculose faussement positifs et notamment liées soit à des contaminations de fibroscopes ou de laboratoire. Ces méthodes d'épidémiologie moléculaire sont devenues les compléments indispensables à la conduite d'enquêtes épidémiologiques classiques.

2.2.1. Transmission récente et facteurs de risque

L'utilisation de l'épidémiologie moléculaire pour étudier la transmission récente de *M. tuberculosis* repose sur l'hypothèse que tous les isolements d'une même souche présentent le même profil génomique et que les autres souches présentent des profils différents. Les souches à profil identique, ainsi que les patients qui les hébergent sont regroupés en grappes (*clusters*) considérées comme appartenant à une même chaîne de transmission. Aux Pays-Bas, le typage systématique de tous les isolements de *M. tuberculosis* instauré en 1993 a montré que la formation des grappes dépendait fortement de la durée de l'étude. Lors d'une étude courte de moins de deux ans, le cas index et l'ensemble des cas secondaires ne pourront pas être identifiés, ce qui contribuera à sous-estimer la part de transmission récente dans la population. Les conditions à réunir pour la réussite de telles enquêtes dans des populations et les précautions à prendre pour l'interprétation des résultats ont fait l'objet d'une revue dans le cadre d'une action concertée européenne.
De telles études mettent en évidence les facteurs de risque associés à l'inclusion dans des groupes de transmission ainsi que les lieux à risque. L'infection par le VIH apparaît comme un facteur de risque à New York mais ni aux Pays-Bas ni dans aucune des études françaises. En France, les études menées en région parisienne, dans le département du Nord, dans la communauté urbaine de Brest, en Guadeloupe et en Gironde indiquent généralement les mêmes facteurs de risque, à savoir le jeune âge, le sexe masculin, la précarité de l'habitat et la forme pulmonaire de la tuberculose. L'alcoolisme a également été identifié comme facteur de risque à Brest. Parmi les lieux à risque identifiés figuraient un foyer d'hébergement et un bar. Les recommandations d'un atelier d'experts (Bordeaux, 2000) soulignent l'importance d'un réseau bien construit comportant des épidémiologistes, bactériologistes et cliniciens lors de la réalisation des études de transmission de tuberculose.

2.2.2. Réactivation endogène

Le pourcentage de transmission récente s'oppose à celui de réactivation endogène pour expliquer l'apparition de cas de tuberculose. Dans les pays à faible prévalence, il est généralement admis que la plupart des cas diagnostiqués sont consécutifs à des réactivations. Les études d'épidémiologie moléculaire indiquent, selon les régions étudiées, des pourcentages variables de transmission récente, estimés par la part de patients inclus dans des grappes sur la base de profils génomiques de souches identiques. À New York et San Francisco, le pourcentage de transmission récente était estimé au début des années 1990 à environ 40 %, un chiffre qui a justifié l'implantation de vigoureuses mesures de lutte antituberculeuse, avec notamment traitement standardisé et supervisé. Ces mesures ont entraîné un changement drastique des tendances épidémiologiques, bien mis en évidence par des études de typage moléculaire. Ainsi, à New York, de 1993 à 1999, le nombre total de cas de tuberculose a chuté de deux tiers et la proportion de cas groupés a diminué de moitié. En Europe, on retrouve des pourcentages de cas en grappes allant de 16 % à 46 %, indiquant que la transmission récente peut constituer une part importante des « nouveaux cas de tuberculose », même dans les pays à faible prévalence de tuberculose. Une étude réalisée en région parisienne indique que l'infection d'acquisition récente est fréquente chez les personnes

âgées (30 % des patients de plus de 60 ans sont inclus dans des groupes de transmission). Cette observation confirme les conclusions issues de l'analyse rétrospective des données étudiant la résistance primaire en France.

L'étude des liens épidémiologiques entre patients inclus dans les mêmes grappes montre que la transmission entre patients peut s'opérer à l'occasion de contacts transitoires, difficiles à repérer par les méthodes épidémiologiques classiques d'investigation autour d'un cas et sur la base de questionnaires. Selon la règle des cercles concentriques de contacts, jusqu'à 40 % des cas représentent des contacts du troisième cercle. Alors que les patients à frottis négatif en microscopie sont considérés comme de rares sources d'infection, le typage moléculaire contribue à établir que ces patients peuvent expliquer jusqu'à 17 % des cas secondaires. Ainsi, les résultats d'épidémiologie moléculaire peuvent aider à réorienter les questionnaires des patients pour tenter de mieux élucider les circonstances de transmission et les facteurs de risque associés.

2.2.3. Réinfection exogène

La réinfection exogène avait déjà été estimée par Styblo comme une contribution importante à l'ensemble des cas de tuberculose dans les zones à haute prévalence. Styblo s'appuyait sur les résultats de l'intense campagne antituberculeuse effectuée au Groenland dans les années 1950 qui avait conduit à une diminution des cas de tuberculose non seulement parmi les jeunes chez qui la primo-infection était évitée, mais aussi parmi les plus âgés qui avaient été très certainement infectés auparavant. Si les cas de tuberculose dans les tranches d'âge élevées étaient dus à des réactivations, les mesures de prévention auraient dû être sans effet chez ces patients. Le typage moléculaire a mis en évidence la pertinence de cette hypothèse. La réinfection exogène peut survenir chez les immunodéprimés comme chez les immunocompétents. Dans un pays à forte prévalence comme l'Afrique du Sud, sur 698 patients suivis pendant six ans, 12 des 16 rechutes étaient dues à une souche distincte de celle du diagnostic initial et correspondaient en fait à des réinfections exogènes. De même, des cas de réinfection exogène sont signalés dans des pays de faible prévalence.

Si les différences de profils génomiques indiquent sans ambiguïté que les souches sont distinctes, l'identité des profils n'est pas nécessairement indicative de l'identité des souches. Plusieurs explications doivent être considérées : un cas de transmission récente, la réactivation simultanée d'une infection ancienne due à la même souche, la prédominance d'une souche locale ou une erreur de laboratoire. Par exemple, en Arkansas, des patients sans aucun lien épidémiologique présentent des souches à profils identiques. De même, au Cameroun, les deux tiers des patients présentent des souches à profils génomiques absolument identiques. Il est bien évident que dans ces régions, le typage moléculaire n'a aucune valeur épidémiologique ou du moins un intérêt limité.

2.2.4. Surveillance de la transmission de la tuberculose multirésistante

Les premières applications du typage moléculaire de *M. tuberculosis* ont concerné les épidémies de tuberculoses multirésistantes décrites aux États-Unis

au début des années 1990. Les bacilles dits multirésistants sont résistants aux deux antituberculeux majeurs, isoniazide et rifampicine, et entraînent des difficultés thérapeutiques. Les épidémies sont survenues dans les hôpitaux, dans des prisons ou des centres d'hébergement. Le typage moléculaire a démontré la clonalité de la souche impliquée dans chaque établissement. Les patients, dans leur grande majorité, appartenaient aux milieux défavorisés des grandes villes, présentaient un stade avancé de sida et 80 à 90 % d'entre eux décédaient dans les trois mois suivant le diagnostic.

Le typage systématique des souches, instauré à New York en 1991, a identifié une souche unique chez plus de 250 patients hospitalisés pour tuberculose multirésistante. Des isolements de la même souche ont également été retrouvés dans quatre autres états (Georgie, Nevada, Floride, Colorado) chez des patients hospitalisés, des membres de personnel hospitalier et chez des patients incarcérés dans des centres de détention pénitentiaire. En 1997, une évaluation de la dissémination de la souche a montré l'apparition de nouveaux cas dans six autres états (Californie, Maryland, New Jersey, Ohio, Pennsylvanie, Caroline du Sud) et à Puerto Rico. Cette même souche a été à l'origine d'une transmission nosocomiale à Paris en 1995 où deux patients au stade sida ont été impliqués, le cas index revenant d'un séjour à New York.

Des banques de profils génomiques ont été constituées à l'échelle européenne, les données épidémiologiques des patients étant supervisées par EuroTB. Grâce à la collaboration des laboratoires qui isolent des bacilles de la tuberculose multirésistants en France, le Centre national de référence (CNR) des mycobactéries à l'Institut Pasteur réalise le typage moléculaire des bacilles multirésistants depuis 1993. L'analyse de la période 1995–2000, portant sur 164 souches représentant 143 malades, montre que 30 % des cas sont inclus dans des groupes de transmission. Les groupes sont le plus souvent de petite taille avec deux patients, indiquant un contrôle globalement efficace de la transmission. Aucune épidémie nosocomiale n'a été mise en évidence sur la période, contrairement aux événements du début des années 1990. Parmi l'ensemble des 143 patients, sept donnent lieu à des isolements dont la posivité persiste sur plusieurs années. Ces patients, qui restent contagieux, constituent d'importantes sources d'infection comme le montre la présence de cinq d'entre eux dans des groupes de transmission. Ils méritent une surveillance particulièrement attentive, avec un suivi médical étroit.

2.2.5. Contamination des prélèvements

Le typage moléculaire contribue efficacement à éclaircir les épisodes de contaminations des prélèvements par des bacilles de la tuberculose exogènes à ces prélèvements, soit du fait de contaminations de laboratoire, soit à cause de défauts de stérilisation des fibroscopes. Ces isolements exogènes donnent généralement lieu à des délais diagnostiques, et sont à l'origine de mises sous traitement antituberculeux inutiles. Il faut rappeler la grande résistance des bacilles de la tuberculose aux antiseptiques usuels et la nécessité de la stricte application des recommandations de la circulaire DGS/DH n° 236 du 2 avril 1996.

Les contaminations de laboratoire peuvent se traduire par des isolements de bacilles de la tuberculose à partir de prélèvements qui n'en contenaient pas à l'origine. La manipulation des prélèvements nécessaires à la mise en culture

des bacilles de la tuberculose génère la formation importante d'aérosols. Si l'un des prélèvements est riche en bacilles, les aérosols infectieux formés peuvent se déposer dans les autres prélèvements et donner lieu à des isolements faussement positifs. Le typage moléculaire permet d'authentifier ces cas. Certaines études rapportent jusqu'à 10 % de cas de contamination parmi les isolements réalisés dans un même laboratoire. Pour éviter les conséquences néfastes de ces incidents, il a été proposé que la possibilité de contamination de laboratoire soit suspectée pour tous les isolements obtenus en sept jours et présentant le même profil génomique.

3. Conclusion

Le typage moléculaire des bacilles de la tuberculose s'avère un outil épidémiologique majeur qui permet de confirmer la nature clonale de l'infection, d'établir le tracé de l'infection et de déterminer les groupes de transmission autour d'un cas, de définir la part respective de l'acquisition récente de la réactivation et de la réinfection exogène dans les zones à haute prévalence de tuberculose. En dehors du contexte du laboratoire où il s'avère très efficace pour détecter et confirmer les contaminations de prélèvements, son utilisation doit s'insérer dans des réseaux où se retrouvent bactériologistes, épidémiologistes et cliniciens. Ces méthodes ont donné lieu en France à l'étude de la transmission de la tuberculose dans différents départements et à la définition des facteurs de risque associés (essentiellement la précarité de l'habitat). La surveillance de la transmission de la tuberculose multirésistante, assurée par typage systématique depuis 1995 et intégrée au réseau européen EuroTB, montre un contrôle globalement efficace.

Pour en savoir plus

Bifani PJ, Mathema B, Liu Z, Moghazeh SL, Shopsin B, Tempalski B, et al. Identification of a W variant outbreak of *Mycobacterium tuberculosis* via population-based molecular epidemiology. J Am Med Ass 1999 ; 282 : 2321-7.

Bonora S, Gutierrez MC, Di Perri G, Brunello F, Allegranzi B, Ligozzi M, et al. Comparative evaluation of ligation-mediated PCR and spoligotyping as screening methods for genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* strains. J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 3118-23.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature 1998 ; 393 : 537-44.

Elia-Pasquet S, Dabis F, Decludt B, Texier-Maugein J, Tessier JF. Transmission de la tuberculose en France. Compte-rendu d'un atelier d'experts, Bordeaux, 16 novembre 2000. Bull Epidemiol Hebd 2002 ; 2 : 5-9.

Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, Kremer K, van Soolingen D. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis* : a systematic review. Emerg Infect Dis 2002 ; 8 : 843-9.

Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol 1997 ; 35 : 907-14.

Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PW, Martin C, et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of

Mycobacterium tuberculosis complex strains : interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 2607-18.

Murray M, Nardell E. Molecular epidemiology of tuberculosis : achievements and challenges to current knowledge. Bull World Health Organ 2002 ; 80 : 477-82.

Styblo K. Epidemiology of tuberculosis. Jena : Gustav Fischer Verlag ; 1984.

Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. Mol Microbiol 2000 ; 36 : 762-71.

van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting : recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol 1993 ; 31 : 406-9.

van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections : main methodologies and achievements. J Intern Med 2001 ; 249 : 1-26.

Viana-Niero C, Gutierrez C, Sola C, Filliol I, Boulahbal F, Vincent V, et al. Genetic diversity of *Mycobacterium africanum* clinical isolates based on IS*6110*-restriction fragment length polymorphism analysis, spoligotyping, and variable number of tandem DNA repeats. J Clin Microbiol 2001 ; 39 : 57-65.

Grâce à l'acharnement des médecins et des biologistes qui nous ont précédés, la tuberculose bénéficie heureusement aujourd'hui d'un traitement standardisé adapté et efficace. La diminution de l'incidence de la tuberculose pouvait laisser prévoir son éradication et donc aussi la fermeture des laboratoires de mycobactériologie. Il aurait pu en être ainsi sans la persistance de la pauvreté, les échanges intercontinentaux, le sida, etc. Les laboratoires de mycobactériologie ont donc toujours un rôle important en France où l'on déclare chaque année environ 6 000 cas de tuberculose dont la létalité est de 10 %.
Les bacilles de la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis, M. bovis, M. africanum*) se distinguent des autres bactéries par de nombreuses propriétés (structure de la paroi, propriété tinctoriale d'acido-alcoolo-résistance, croissance lente, pathogénicité, exigences culturales...) (voir chapitres précédents). Les antibiotiques actifs sur les bacilles de la tuberculose, dits antituberculeux, sont pour certains spécifiques, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas actifs sur d'autres bactéries. Les méthodes utilisées pour éprouver la sensibilité des souches aux antibiotiques ont été définies par une confrontation rigoureuse bactério-clinique. Les techniques bactériologiques mises en œuvre pour l'étude de la sensibilité de *M. tuberculosis* aux antituberculeux sont par conséquent spécifiques, ce qui oblige chaque laboratoire ayant un secteur de mycobactériologie à s'équiper (hottes aspirantes de type PSM1, étuves pour conservation longue, milieux typiques) et à s'organiser (temps long passé pour l'ensemencement, les lectures, rendu des résultats sur trois à six mois, etc.) de façon particulière. La nouveauté est que, depuis le milieu des années 1990, les laboratoires se sont engagés dans une approche diagnostique nouvelle utilisant la biologie moléculaire, ce qui a rendu les mycobactéries presque comme « des bactéries comme les autres ».
Le laboratoire de mycobactériologie est l'un des pivots de la surveillance de la tuberculose au niveau d'un hôpital, d'un quartier, d'une ville, d'un département. Lui seul permet d'avoir des données pour la surveillance de la résistance aux antituberculeux. D'autant plus qu'il a maintenant aussi la charge de signaler les nouveaux cas de tuberculose aux autorités sanitaires et de compléter la déclaration obligatoire du médecin en charge du malade. Comme nous le détaillerons, une collaboration étroite est nécessaire entre le mycobactériologiste et le clinicien afin de tout mettre en œuvre pour à la fois guérir le malade de sa tuberculose et empêcher la transmission de la maladie.

1. Historique du traitement antituberculeux

La tuberculose atteint l'homme depuis la préhistoire, mais l'histoire de la chimiothérapie antituberculeuse n'a, elle, qu'une cinquantaine d'années (Tableau 10.1).
Le premier antituberculeux découvert en 1944 est la streptomycine. Son efficacité est démontrée en 1948 lors de la publication du premier essai thérapeutique. Dès cette publication, il apparaît que le bénéfice initial est contrecarré par la sélection de mutants résistants sous traitement.
En 1950, l'association du PAS (acide para-amino-salicylique) à la streptomycine permet la guérison de la tuberculose en évitant la sélection de mutants résistants à la streptomycine. En 1952, la triple association isoniazide (INH), streptomycine et PAS permet d'atteindre des taux de guérison de 90 à 95 %

4.1. Isoniazide

L'isoniazide est l'hydrazide de l'acide nicotinique. L'isoniazide n'est actif que sur les mycobactéries, et presque seulement sur les mycobactéries du complexe *tuberculosis*. Il inhibe la synthèse des acides mycoliques, composants majeurs de la paroi des mycobactéries, et favorise la formation de radicaux libres toxiques pour la cellule bactérienne.

Dès le début de l'utilisation de l'isoniazide, une association entre résistance et perte de l'activité catalasique avait été observée chez les souches résistantes, mais ce n'est qu'en 1992 qu'il a été montré que le gène *katG*, qui code la catalase-peroxydase, est indispensable à l'activation de l'isoniazide dans la bactérie. Les changements de conformation de cette enzyme, liés aux mutations du gène *katG*, empêchent la transformation de l'isoniazide en produit actif. La mutation la plus souvent observée survient dans le codon 315. Les mutations *katg* sont observées chez environ la moitié des souches résistantes à l'isoniazide, en particulier chez les souches de haut niveau de résistance (CMI > 1 mg/l).

Le gène *inhA* code une réductase liant le NADH, l'*enoyl-acyl carrier protein reductase*, enzyme impliquée dans la synthèse des acides gras à longue chaîne (système Fas2). Des mutations de ce gène ont été observées chez environ 10 à 30 % des souches résistantes à l'isoniazide, le plus souvent dans les séquences régulatrices et promotrices. La résistance à l'isoniazide par mutation du gène *inhA* se traduit par un bas niveau de résistance (0,2 mg/l < CMI > 1 mg/l) et est croisée avec la résistance à l'éthionamide, dont la structure est proche de celle de l'isoniazide.

Des mutations dans d'autres gènes (*ahpC, ndh, kasA*) ont été observées chez des souches résistantes à l'isoniazide, mais leur rôle dans la résistance est encore à démontrer.

4.2. Rifampicine

La rifampicine et les autres rifamycines (rifabutine, rifapentine) empêchent l'initiation de la transcription en se fixant sur la sous-unité β de l'ARN polymérase. La résistance à la rifampicine chez *M. tuberculosis*, qui est d'ailleurs croisée avec la résistance à la rifabutine et la rifapentine, est liée à un mécanisme bien connu chez les bactéries autres que les mycobactéries. Il s'agit de mutations dans le gène *rpoB* codant la sous-unité β de l'ARN polymérase au niveau d'un domaine qui s'étend du codon 507 au codon 533 (numérotation de *E. coli*). Ces mutations sont le plus souvent ponctuelles (changement d'un nucléotide au sein d'un codon), les plus fréquentes étant la mutation du codon sérine 531 (Ser 531 → Leu dans 90 % des cas mais aussi Ser → Gln ou Trp), observée chez environ la moitié des souches de *M. tuberculosis* résistantes à la rifampicine, et celle du codon histidine 526 (His → Tyr, Asp ou Arg ou autre) observée chez un tiers des souches résistantes (Fig. 10.2). Ces mutations sont associées à un haut niveau de résistance à la rifampicine (CMI > 64 mg/l).

Contrairement aux mutations décrites pour la résistance à l'isoniazide, les mutations du gène *rpoB* sont observées chez la quasi-totalité des souches résistantes étudiées à ce jour. Aussi, l'analyse des mutations du gène *rpoB*

Les résultats sont obtenus après quatre à six semaines d'incubation, délai nécessaire au développement des colonies. Il sont donc obtenus deux à trois mois après la mise en culture du prélèvement, quand l'antibiogramme est effectué à partir des colonies de la primoculture (antibiogramme « indirect »). Ils peuvent l'être en même temps que la primoculture si on effectue l'antibiogramme directement à partir du prélèvement (antibiogramme « direct »). Ceci est possible si le prélèvement est riche en bacilles (> 1 BAAR/champ après coloration fluorescente ; objectif × 25).

5.3. Antibiogramme en milieu liquide

Il est aussi possible de détecter, au sein d'une souche de *M. tuberculosis*, une proportion de mutants résistants de 1 % en comparant la croissance en milieu liquide d'un inoculum « pur » et celle du même inoculum dilué au 1/100e. La mesure de la croissance se fait par radiométrie (Bactec 460 TB), par fluorescence (MGIT 960) ou par colorimétrie (BacTAlert 3D). Ceci permet de raccourcir le délai de réponse de cinq à 14 jours car la croissance en milieu liquide est plus rapidement détectée qu'en milieu solide. Cette méthode n'est pas standardisée pour la sensibilité aux antituberculeux de deuxième ligne. En cas de résultats douteux, il est recommandé de déterminer la proportion exacte de mutants résistants sur milieu solide.

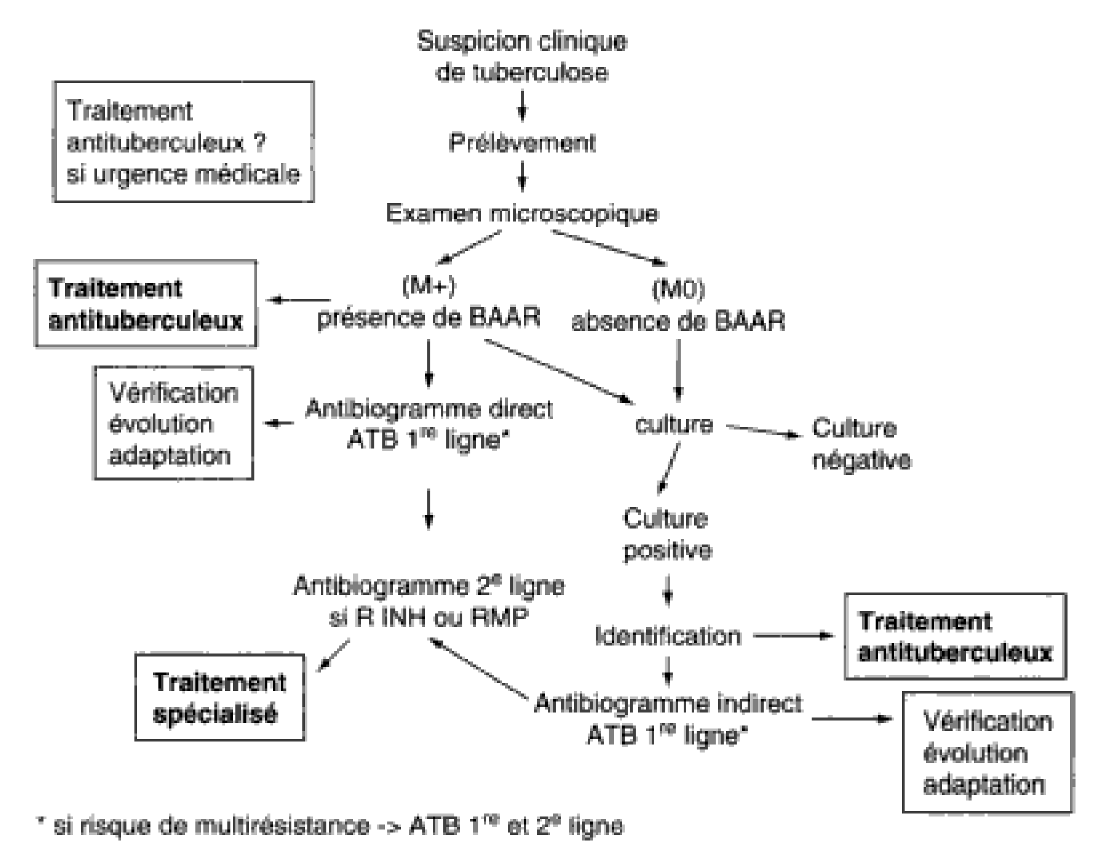
5.4. Détection de la résistance aux antituberculeux par méthode de biologie moléculaire

Les mutations responsables de la résistance aux antibiotiques peuvent être identifiées après amplification des gènes (ou fragments de gènes) sur lesquelles elles sont localisées (Tableau 10.4, Fig. 10.2).

Tableau 10.4
Détection génotypique de la résistance aux antituberculeux chez *Mycobacterium tuberculosis*

Antibiotiques	% souches R avec mutation	Nombre gènes impliqués	Impact thérapeutique de la résistance	Difficultés méthodes phénotypiques	Priorité
Isoniazide	85	4	++	0	
Rifampicine	95	1	++++*	0	1
Pyrazinamide	80	1	++	++++	2
Éthambutol	70	1	+/–	+/–	
Streptomycine	70	2	+	0	
Kana/amikacine	50	1	+	+/–	
Fluoroquinolones	95	1	++	+	3
Thioamides	70	2	++	+++	

*Marqueur de multirésistance.



* si risque de multirésistance -> ATB 1re et 2e ligne

Figure 10.3. Rôle du laboratoire dans l'instauration du traitement antituberculeux.

La fiabilité des résultats de l'examen microscopique repose sur l'entraînement du microscopiste et la mise en place de contrôles de qualité internes. La transmission et la discussion des résultats positifs avec le médecin en charge du malade permet la mise au traitement antituberculeux, la prise de mesures de prévention, le signalement au conseil général et la déclaration à la DDASS. Afin de prévenir la transmission nosocomiale de la tuberculose, il est important de transmettre aussi le résultat à l'équipe d'hygiène hospitalière et au médecin du travail ;

– deuxième étape : culture ; dans les cas où l'examen microscopique était négatif, mais où la culture est positive (environ la moitié des cas de tuberculose bactériologiquement documentés), l'identification entraîne la transmission des informations comme ci-dessus.

Des tests de sensibilité aux antituberculeux de première ligne sont mis en route à partir de la culture (antibiogramme « indirect ») ;

– troisième étape : antibiogramme ; dès la disponibilité des résultats des tests de sensibilité (de trois à six semaines en milieu solide et cinq à 14 jours en milieu liquide après sa réalisation), l'observation d'une résistance à l'isoniazide ou à la rifampicine doit être signalée le plus rapidement possible au médecin en charge du malade, et confirmée par un nouveau test si nécessaire (proportion à la limite du 1 %, résistance isolée à la rifampicine, doute quelconque, mauvais contrôle interne). En cas de résistance à l'isoniazide et à la rifampicine (= multirésistance), il est indispensable de mettre en route un antibiogramme complémentaire afin de tester la sensibilité aux antituberculeux de deuxième ligne. Ceci nécessite en général l'envoi de la souche à un laboratoire spécialisé.

Tableau 10.5
Fiche de surveillance d'un cas de tuberculose à bacille multirésistant (d'après l'OMS)

Nom du patient :
Âge : Sexe :
Adresse :

Dates et traitements	Examen microscopique	Culture	Antibiogramme	Radiologie	Clinique
Date du diagnostic :					
Date du début du 1er traitement :					
Nom et posologie des antituberculeux :					
Date d'arrêt du 1er traitement :					
Date du début du 2e traitement :					
Nom et posologie des antituberculeux :					
Date d'arrêt du 2e traitement :					
Date de début du 3e traitement :					

À continuer si nécessaire pour le 3e, 4e et énième traitement.

les résultats de l'antibiogramme avant de débuter le traitement. Si l'état clinique du patient ne permet pas ce délai (quatre à six semaines), le traitement est débuté en associant tous les antituberculeux disponibles (quatre à cinq en général) que le patient n'a encore jamais reçus. L'écueil à éviter absolument est l'introduction un à un de nouveaux antituberculeux, qui est la meilleure façon de sélectionner des bacilles avec de nouvelles résistances. Comme il est précisé dans le document de l'OMS, le traitement qui sera mis en place est la dernière chance qui peut éviter la mort du malade.
En cas de confirmation de MDR, le traitement comprendra une association d'antituberculeux de deuxième ligne (aminosides, thioamides et fluoroquinolones), associés bien sûr aux antituberculeux de première ligne (pyrazinamide, éthambutol) auxquels la souche est encore sensible. La durée du traitement sera pour la phase initiale intensive de trois mois minimum (jusqu'à négativation des examens microscopiques), et de 18 mois minimum pour la phase d'entretien.

9. Évaluation d'un nouvel antituberculeux

Bien que l'on dispose de régimes thérapeutiques efficaces contre la tuberculose, cette maladie continue à progresser pour diverses raisons (lourdeur et longueur du traitement entraînant une mauvaise « adhérence », souches

résistantes...). C'est pourquoi on a besoin de nouveaux antituberculeux (Fig. 10.6) qui permettraient :
– d'alléger le traitement ou de l'administrer en intermittent, ce qui permettrait de surveiller la prise des médicaments ;
– de traiter les cas de tuberculose à bacilles résistants aux antibiotiques actuellement administrés.
En préalable à tout essai chez l'homme, l'évaluation d'un nouvel antituberculeux exige la démonstration séquentielle de son activité in vitro et de son activité in vivo dans le modèle expérimental (modèle souris). Elle exige aussi des études de pharmacologie et de toxicologie à court et long termes.
In vitro, il est nécessaire d'établir la concentration minimale inhibitrice de l'antibiotique vis-à-vis de *M. tuberculosis* en testant différentes souches sensibles et résistantes aux antibiotiques. Il faut aussi réunir des données précises sur la pharmacocinétique chez l'homme et chez la souris (demi-vie sérique, concentration sérique maximale, aire sous la courbe...). Ces données sont fondamentales pour choisir les posologies à éprouver chez la souris de manière à ce que les résultats observés chez l'animal soient extrapolables à l'homme.
Chez la souris, l'évaluation débute avec la détermination de la dose minimale qui, administrée juste après l'infection (avant le développement de la maladie), va empêcher la multiplication des bacilles, donc le développement des lésions et la mortalité. Si la dose minimale est compatible avec les données pharmacocinétiques et toxicologiques observées chez l'homme, l'évaluation se poursuit chez l'animal par la mesure de l'activité bactéricide puis de l'activité

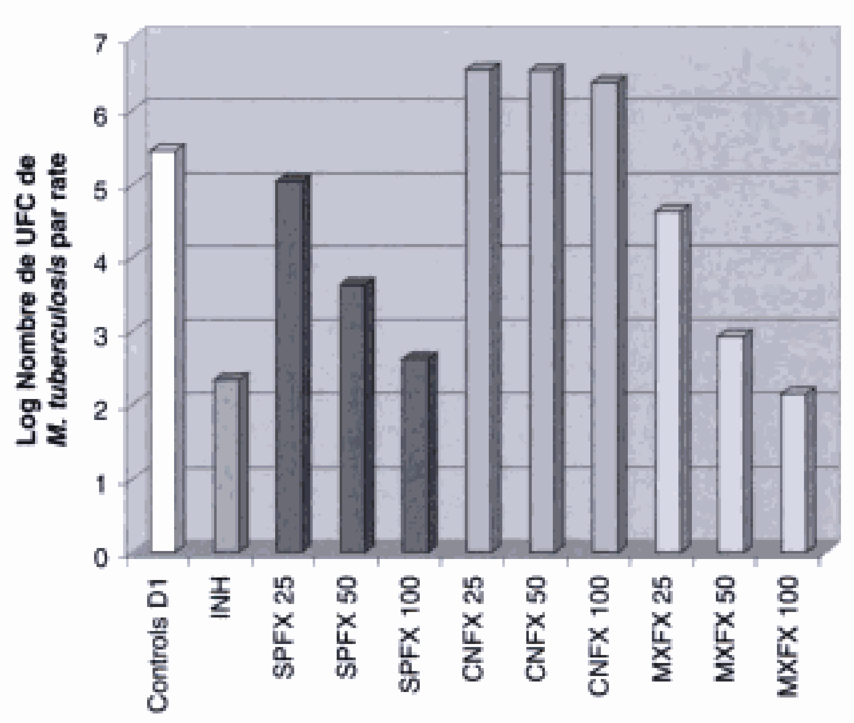


Figure 10.6. Nombre de *M. tuberculosis* (UFC) trouvés dans la rate des souris infectées et traitées par fluoroquinolones pendant quatre semaines.
INH : isoniazide ; SPFX : sparfloxacine ; CNFX : clinafloxacine ; MFX : moxifloxacine.
(D'après Ji et al. Antimicrob Agents Chemother 1998 ; 42 : 2066-9).

stérilisante (détermination précise de l'évolution de la population bacillaire sous traitement par l'antibiotique employé seul et en association).
Chez l'homme, étant donné la gravité de la maladie et le risque de sélection de mutants résistants, il n'est pas possible d'administrer l'antibiotique seul pendant une période prolongée pour étudier son activité. L'évaluation consiste donc à procéder, en double aveugle et après avis d'un comité d'éthique, à la comparaison de l'efficacité de la meilleure association antibiotique disponible (association de référence) et de celle d'une association comportant l'antibiotique à évaluer. Cette nouvelle association doit avoir toutes chances d'être au moins aussi efficace que l'association de référence et les malades doivent pouvoir en tirer un bénéfice direct. Le critère principal de l'évaluation est bactériologique.

10. Gestion des données épidémiologiques et relations entre le laboratoire et les services cliniques

La bonne prise en charge des patients tuberculeux nécessite une coopération étroite entre le médecin en charge du malade tuberculeux et le microbiologiste. Ils ont des devoirs l'un envers l'autre afin d'assurer la guérison du malade, et d'éviter la transmission de la tuberculose, transmission nosocomiale si le malade est hospitalisé, ou dans des collectivités (foyers, prisons, familles nombreuses avec enfants), tout cela avec le meilleur rapport coût/efficacité.
Le premier devoir du laboratoire est d'avertir le clinicien dès qu'il découvre des BAAR à l'examen microscopique d'une expectoration, afin de débuter le traitement antituberculeux le plus précocement possible. Ceci est directement bénéfique pour le malade, et permet aussi de prévenir le risque de transmission de la tuberculose parmi le personnel et les autres personnes hospitalisées. Les résultats des tests de sensibilité doivent être transmis dès que possible, surtout si une résistance est suspectée (rechute, immigration d'un pays à forte prévalence de MDR).
Dans l'autre sens, le biologiste attend du clinicien qu'il l'informe en cas de suspicion de tuberculose à bacilles multirésistants, afin de pouvoir mettre en route de façon appropriée des tests de détection de la résistance et des tests de sensibilité aux antituberculeux de deuxième ligne.
Le médecin doit aussi signaler s'il s'agit d'un nouveau cas (pas d'antécédent de traitement antituberculeux), ou d'une rechute (antécédent de traitement antituberculeux supérieur à un mois), afin de contribuer à la surveillance de résistance aux antituberculeux. Enfin, il doit partager avec le biologiste des informations épidémiologiques (infection par le VIH, pays de naissance, date de l'année d'arrivée en France, lieu de vie, vie en collectivité...) afin d'évaluer les risques de transmission et d'alerter les autorités sanitaires en cas d'épidémie. Ces informations sont utilement revues sous formes de fiches ou de dossiers informatisés, qui sont la base du travail de communication avec le clinicien (un exemple est donné Fig. 10.7 avec définition des cas en Tableau 10.6).
Depuis 2001 (Code de la santé publique, article L. 3113-1, décrets du 6 mai 1999 et du 16 mai 2001), le biologiste et le médecin en charge du malade doivent effectuer un signalement immédiat au conseil général et une déclaration à la DDASS pour chaque nouveau cas.

Cas de tuberculose bactériologiquement confirmé

200

NOM.. **Informations bactériologiques :**
Prénom.. **1er examen positif**
Date de naissance ..../.........../......... **Sexe :** **M** **F**

Hospitalisation actuelle **Date d'entrée à l'Hôpital** ....../....../......
Service.............................. Salle .... Lit ....
Dr .... tél. ....
Transféré **de** **vers**
Date ....../....../....../ ....../....../....../
Service ....
Salle ....

Facteurs de risque
– Pays de naissance : ....
– En France depuis : plus de 5 ans moins de 5 ans
– Logement : Privé Foyer Prison SDF Précarité
– Sérologie VIH : Positive Négative non faite CD4........./mm^3
– Terrain particulier : diabète alcoolisme toxicomanie IV précarité
– Traitement immunosuppresseur : chimiothérapie anticancéreuse, corticoïde, autre..............................
– Antécédents tuberculose : oui non année : ....
traitée par S H R Z E autres ....
durée totale du traitement (en mois) : ....
– Contage évident : non oui (préciser : ....)

Date du prélèvement ..../........./......... N° ....
Nature du prélèvement ....
Examen microscopique Positif (Nb baar : ....) Négatif
Amplification *M.tuberculosis* fait le ...../...../..... Positif Négatif
Innolipa RIF TB fait le ....../....../...... : ....
Culture positive le ..../........./.........
nb colonies : 1 à 9 10-99 > 100
Identification *M.tuberculosis* *M.bovis* *M.africanum* BCG
Antibiogramme fait le ..../........./.........
Sensible à SHRZE : oui non
si non, résistant à : S H (niveau de la R à H ..... mg/l) R Z E
autres : ....

Autres prélèvements positifs : 1/...
(date, M+/-, culture) 2/ ....

Informations cliniques
Localisation : pulmonaire
extrapulmonaire : ....
Classification OMS* (Tableau 10.6)
nouveau cas rechute échec chronique
Traitement débuté le ..../........./.........
par H R Z E autres ....

Hospitalisations antérieures (dans les 2 années)

Hôpital	Service	Salle	Entrée	Sortie
....	....	....	.../.../...	.../.../...
....	....	....	.../.../...	.../.../...
....	....	....	.../.../...	.../.../...
....	....	....	.../.../...	.../.../...
....	....	....	.../.../...	.../.../...
....	....	....	.../.../...	.../.../...

Consultations antérieures

– malade suivi dans le Service : ....

par Dr : ....

Explorations avant traitement

– fibroscopie le ...../...../..... où ? ....

– EFR le ...../...../...../..... où ? ....

– autres examens faits en dehors du Service : ....

.... où ?..

Antécédents de vie en ....

– foyer (adresse) ....

....

– prison (adresse)...

Histoire clinique ....

....

....

....

....

Signes cliniques ....

....

....

....

Signes radiologiques ....

....

....

....

Evolution ....

....

....

....

....

....

....

....

* Nouveaux cas : tuberculeux jamais traité ou qui a pris un traitement antituberculeux pendant moins d'un mois.
Rechute : tuberculeux déjà traité et considéré comme guéri à l'issue d'un premier traitement.
Echec : tuberculose restant ou redevenue positive en bactériologie après plus de 5 mois de traitement.
Cas chronique : tuberculose positive en bactériologie après un deuxième traitement pris sous surveillance.

Figure 10.7. Cas de tuberculose bactériologiquement confirmé.

Tableau 10.6
Définitions des cas d'après l'OMS et l'IUATLD

Nouveau cas	N'a jamais eu de traitement antituberculeux, ou traitement < 1 mois
Rechute	A eu un traitement antituberculeux complet, et a de nouveau une tuberculose confirmée bactériologiquement
Guérison	A eu deux prélèvements dont l'examen bactériologique était négatif dont un lors du dernier mois de traitement
Échec	A des prélèvements toujours positifs après cinq mois ou plus de traitement antituberculeux
Récurrence	A des prélèvements positifs mais le traitement a été incomplet et a été arrêté depuis au moins deux mois

Le laboratoire doit établir annuellement un bilan descriptif des cas de tuberculose à culture positive. Ce bilan permet d'être alerté sur une augmentation inhabituelle du nombre de cas, qui peut traduire une épidémie en cours, l'apparition de nouveaux facteurs de risque, ou une modification de la population (par exemple, augmentation du nombre et du type de cas en 1985–1995 liée au sida). La description de ces cas comprend, entre autres, le pourcentage de cas à examen microscopique positif, le pourcentage de résistances (primaire et secondaire, voir chapitre 11) aux antituberculeux, la répartion des cas selon les services, etc. Toute variation significative doit alerter sur une modification de la situation épidémiologique. Les statistiques établies dans les laboratoires ayant une activité de mycobactériologie sont la base des données nationales qui permettent de mesurer l'efficacité des mesures de lutte antituberculeuse.

11. Conclusion

Les mycobactéries responsables de la tuberculose (*M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum*) sont sensibles à un tout petit nombre d'antibiotiques dits antituberculeux. Dès leur utilisation chez l'homme, on a observé des phénomènes de sélection de mutants résistants pour tous les antituberculeux. Parmi les antituberculeux de première ligne, l'isoniazide, le pyrazinamide et l'éthambutol sont spécifiquement actifs sur les mycobactéries car ils inhibent la synthèse des acides mycoliques, composants spécifiques de la paroi. La rifampicine a le même mécanisme d'action et de résistance pour les mycobactéries que pour les autres bactéries.

L'instauration rapide du traitement standard, basé sur ces quatre antituberculeux dits de première ligne, permet d'arrêter la transmission des bacilles à partir des malades dont les prélèvements respiratoires sont positifs à l'examen microscopique (présence de bacilles acido-alcoolo-résistants), c'est-à-dire les plus contagieux. La sensibilité à l'isoniazide et à la rifampicine est éprouvée pour tous les cas de tuberculose, du moins dans les pays industrialisés qui en ont les moyens. Un test de détection rapide de la résistance de la rifampicine

est conseillé en cas de suspicion de résistance (antécédent de traitement antituberculeux mal suivi, malade venant d'un pays à forte prévalence de résistance, sida). La sensibilité aux antituberculeux de deuxième ligne est éprouvée en cas de résistance aux antituberculeux de première ligne. En cas de multirésistance (résistance à l'isoniazide et à la rifampicine), les résultats des tests de sensibilité aux antituberculeux de deuxième ligne sont décisifs pour définir les schémas thérapeutiques (recommandations OMS).
Une collaboration étroite entre le mycobactériologiste et le clinicien est nécessaire pour la mise en œuvre du traitement qui garantira la guérison du malade et l'arrêt de la transmission de la maladie. Ils font aussi, ensemble, le signalement immédiat et la déclaration des cas de tuberculose bactériologiquement confirmés aux autorités sanitaires. L'analyse des données microbiologiques joue un rôle très important pour la surveillance épidémiologique de la tuberculose.

Pour en savoir plus

American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. Am J Resp Crit Care Med 2000 ; 161 : 1376-95.

Canetti G, Rist N, Grosset J. Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions. Rev Tuberc Pneumol 1963 ; 27 : 291-8.

Cambau E, Lemaître N, Sougakoff W, Jarlier V. Résistance aux antituberculeux. Antibiotiques 2003 ; 5 : 29-37.

Fox W, Ellard GA, Mitchison DA. Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council tuberculosis units, 1946–1986, with relevant subsequent publications. Int J Tuberc Lung Dis 1999 : 3 : S231-79.

GBEA mycobactéries, Groupe Azay-mycobactéries : www. microbes-edu.fr

Grosset J, Truffot-Pernot C, Jarlier V. Antituberculeux. In : Carbon C, Régnier B, Saimot G, Vildé JL, Yeni P, Eds. Médicaments anti-infectieux. Paris : Flammarion Médecine-Sciences ; 1994. p. 249-61.

Grosset J. L'approche expérimentale de la chimiothérapie de la tuberculose. Med Mal Infect 1996 ; 26 : 922-925.

Heifets LB, Cangelosi GA. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* : a neglected problem at the turn of century. Int J Tuberc Lung Dis 1999, 3 : 564-81.

Robert J, Trystram D, Truffot-Pernot C, Cambau E, Jarlier V, Grosset J. Twenty-five years of tuberculosis in a french university hospital : a laboratory perspective. Int J Tuberc Lung Dis 2000 ; 4 : 504-12.

WHO. Treatment of tuberculosis : guidelines for national programmes. 1997.

WHO. Crofton J, Chaulet P, Maher D. Guidelines for the management of drug-resistant tuberculosis, World Health Organisation ed. World Health Organisation, Geneva 1997.

Wyplosz B, Truffot-Pernot C, Robert J, Jarlier V, Grosset J. Bactériologie de la tuberculose et des infections à mycobactéries non tuberculeuses. Rev Mal Respir 1997 ; 14 : 5533-48.

Mycobacterium tuberculosis et mycobactéries atypiques

Chapitre 11

Tuberculose et résistance aux antituberculeux en France

Jérôme Robert, David Trystram, Chantal Truffot-Pernot, Vincent Jarlier

Surveillance de la résistance primaire et secondaire aux antituberculeux de première ligne

Surveillance de la tuberculose multirésistante

Réflexion sur l'évolution du nombre de cas de tuberculose recensés à travers les réseaux de microbiologistes

passé de 1 046 en 1995 à 1 313 en 2001. Cependant, en ne comptabilisant que les malades signalés par les 17 laboratoires participant à la surveillance depuis 1995, le nombre annuel de malades est passé de 1 046 en 1995 à 959 en 2001, soit une diminution de 8 % (voir section 3).
Nous donnerons ci-dessous les informations détaillées pour la période 1995–2001.

1.3. Âge des malades

L'âge médian des malades est de 46 ans et 1,5 % des malades ont moins de 14 ans, 57 % ont entre 25 et 59 ans et 16 % ont 75 ans et plus. Parmi les malades nés à l'étranger, 40 % ont entre 25 et 39 ans et 5 % plus de 75 ans alors que chez les malades nés en France, ces proportions sont respectivement de 18 % ($p < 0,01$) et 25, % ($p < 0,01$).
Cette répartition par classe d'âge est très proche de celle obtenue sur la base des cas déclarés (DO) aux autorités sanitaires.

1.4. Sexe des malades

Près de 65 % sont des hommes, ce qui est habituel (sex ratio classique de la tuberculose : trois hommes pour deux femmes).

1.5. Pays de naissance

En moyenne, 54 % des malades sont nés en France, et 39 % sont nés à l'étranger (le pays de naissance est inconnu pour le reste des malades).

1.6. Co-infection par le VIH

Près de 10 % des malades sont co-infectés par le VIH. Les malades pour lesquels l'information sur la co-infection par le VIH est inconnue ont été considérés séronégatifs.

1.7. Antécédents de traitement antituberculeux

La proportion de malades ayant des antécédents de traitement antituberculeux est restée stable, autour de 8 %, entre 1995 et 2001, ce qui est en faveur d'une bonne prise en charge des nouveaux cas de tuberculose en France.

1.8. Résistance primaire

Chez les malades sans antécédent de traitement (nouveaux cas), le pourcentage de résistance (résistance primaire) à au moins un des quatre antituberculeux majeurs (Tableau 11.1, Fig. 11.1) est en moyenne de 9,4 % mais il a augmenté un peu, mais de manière significative, de 7,9 % en 1995 à 11,1 % en 2001 (p = 0,03, chi2 de tendance). Le taux de résistance « primaire » pour chacun des antituberculeux (Fig. 11.2) est respectivement en 1995 et 2001 de : 7,0 % et 9,8 % pour SM (p = 0,03), 3,7 % et 3,8 % pour INH

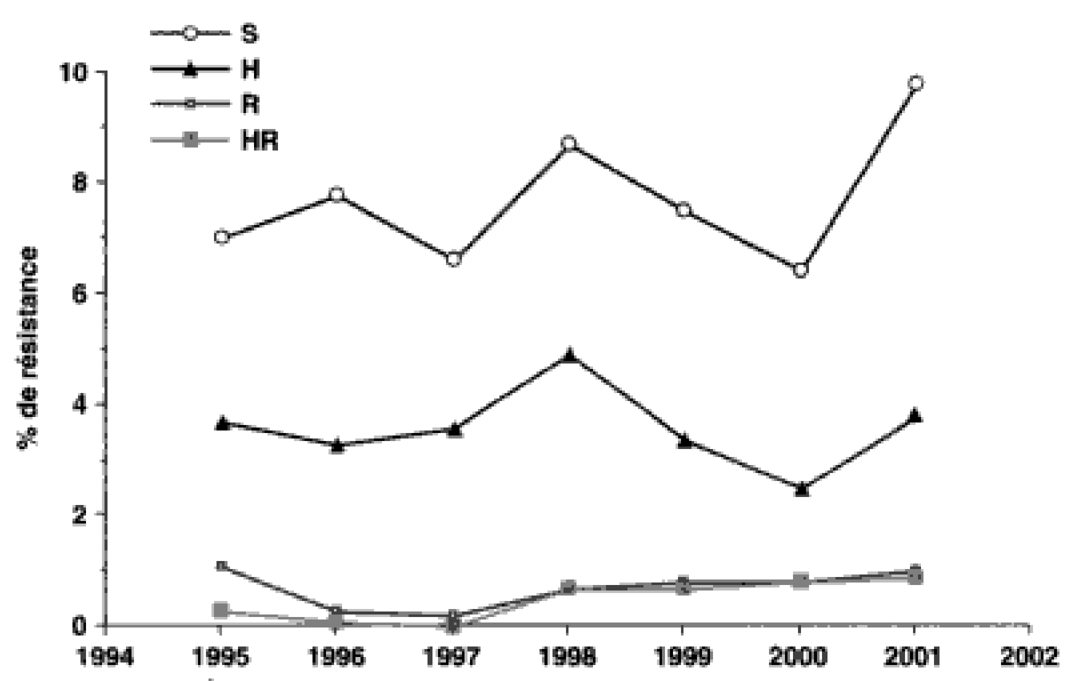


Figure 11.2. Évolution de la résistance à la streptomycine (S), l'isoniazide (H), la rifampicine (R) et l'association isoniazide + rifampicine (HR) chez les nouveaux cas de tuberculose (résistance « primaire »).

Chez les malades nés en France et non co-infectés par le VIH, le taux de résistance à au moins un antituberculeux est resté stable autour de 7 % alors qu'il est passé de 8,6 % en 1995 à 16,7 % en 2001 chez les malades co-infectés par le VIH, mais cette augmentation n'est pas statistiquement significative ($p = 0,16$). Chez les malades nés à l'étranger et non co-infectés par le VIH, le taux de résistance est passé de 7,9 % en 1995 à 13,7 % en 2001, mais cette augmentation n'est pas significative ($p = 0,11$).

1.9. Résistance secondaire

Chez les malades ayant déjà reçu un traitement antituberculeux (cas déjà traités), le pourcentage de résistance (résistance « secondaire » ou « acquise ») à au moins un des quatre antituberculeux majeurs est en moyenne de 20,5 %, soit le double de celui enregistré pour les nouveaux cas.
Le pourcentage de résistance secondaire est passé de 23,0 % en 1995 à 12,3 % en 2001 (Tableau 11.1, Fig. 11.1), mais cette diminution n'est pas significative ($p = 0,28$, chi2 de tendance). Le taux de résistance secondaire à chacun des antituberculeux majeurs est respectivement en 1995 et 2001 de : 11,8 % et 6,9 % pour SM ($p = 0,38$), 16,8 % et 9,8 % pour INH ($p = 0,10$), 8,0 % et 4,9 % pour RMP ($p = 0,90$) et 5,3 % et 3,9 % pour INH + RMP (multirésistance) ($p = 0,42$). Le taux de résistance « secondaire » à EMB est resté stable autour de 2 %.
Chez les malades nés en France et non co-infectés par le VIH, le taux de résistance est resté stable autour de 11 % alors qu'il a fluctué autour de 30 % chez les malades nés à l'étranger. Le faible nombre de malades ne permet pas d'analyse stratifiée pour les groupes de malades co-infectés par le VIH.

En conclusion, les taux de résistance aux antituberculeux majeurs sont restés relativement stables en France pendant les sept années de la surveillance, aussi bien chez les malades sans antécédent de traitement (avec toutefois une petite augmentation de la résistance à SM) que chez les malades déjà traités (avec toutefois une tendance à la diminution). Le taux élevé de résistance chez les malades nés à l'étranger et déjà traités impose une surveillance régulière de la résistance aux antituberculeux.
Ces données sont intégrées aux systèmes de surveillance organisés par l'Europe dans le cadre d'EuroTB et de l'OMS.

2. Surveillance de la tuberculose multirésistante

La surveillance de la tuberculose multirésistante en France est assurée par le CNR à travers un réseau de 350 laboratoires correspondants. Chaque année, les laboratoires du réseau colligent le nombre de malades pour lesquels une souche de bacille tuberculeux a été isolée et, parmi ceux-ci, le nombre de malades porteurs d'une souche résistante simultanément à l'isoniazide et à la rifampicine (multirésistants).
Depuis 1992, de 26 à 58 cas de tuberculose à bacilles multirésistants (MDR) ont été signalés chaque année au CNR, ce qui représente 0,5 à 0,7 % du nombre total de cas de tuberculose bactériologiquement confirmée (Tableau 11.2).
Un fait épidémiologique très important est que, chaque année, une proportion notable des cas MDR était déjà connue depuis une ou plusieurs années (Tableau 11.3). Ceci signifie que ces cas n'étaient pas traités efficacement et étaient restés pendant plusieurs années des sources actives de contamination à bacilles multirésistants.
Les caractéristiques des 222 cas de tuberculose à bacilles multirésistants signalés durant les sept années, de 1992 à 1998, sont données dans le Tableau 11.4. La grande majorité des malades sont des hommes (70,7 %) et plus de la moitié (54,5 %) sont nés à l'étranger. Près de la moitié (44,6 %) sont âgés de 25 à 39 ans et 21 % sont séropositifs pour le VIH. La grande majorité des malades (78,4 %) a une localisation tuberculeuse pulmonaire isolée et 13,1 % une localisation extrapulmonaire isolée. L'examen microscopique est positif dans 57,7 % des cas.

Tableau 11.2
Nombre de cas de tuberculose à bacilles multirésistants et nombre de cas de tuberculose à culture positive de 1992 à 1999

Caractéristique	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999
Bacille multirésistant	48	40	58	40	29	26	39	48
Tuberculose à culture positive	8 441	8 539	7 751	7 119	6 441	5 917	5 766	5 597
Prévalence (%)	0,6	0,5	0,7	0,6	0,5	0,5	0,7	0,9

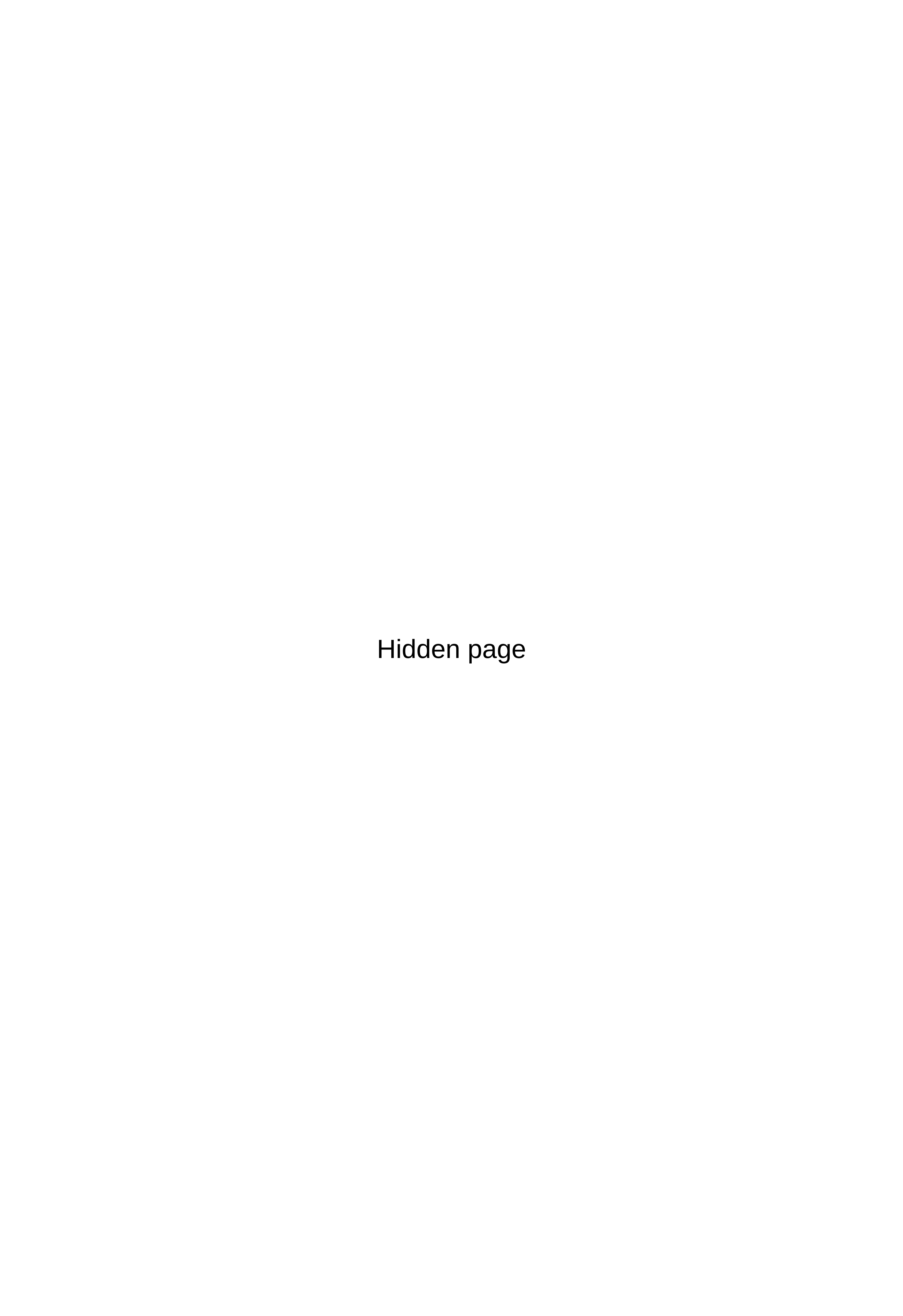

Hidden page

Tableau 11.4
Caractéristiques de l'ensemble des 222 cas de tuberculose à bacilles multirésistants aux antibiotiques signalés de 1992 à 1998

	Total des malades		Malades déjà traités		Nouveaux cas	
	n	%	*n*	%	*n*	%
Total	222	100	152	100	68	100
Âge						
15–24 ans	14	6,3	10	6,6	4	5,9
25–39 ans	99	44,6	67	44,1	31	45,6
40–59 ans	62	27,9	39	25,6	22	32,3
60–75 ans	36	16,2	29	19,1	7	10,3
75 ans et plus	11	5,0	7	4,6	4	5,9
Sexe						
Masculin	157	70,7	114	75,0	41	60,3
Féminin	65	29,3	38	25,0	27	39,7
Pays de naissance						
France	101	45,5	67	44,1	34	50,0
Autres pays	121	54,5	85	55,9	34	50,0
Sérologie VIH						
Positive	49	21,1	25	16,4	22	32,4
Négative	138	63,2	98	64,5	40	58,8
Inconnue	35	15,7	29	19,1	6	8,8
Localisation de la tuberculose						
Pulmonaire	174	78,4	126	82,9	46	67,6
Extrapulmonaire	29	13,1	9	5,9	8	11,8
Mixte	19	8,5	17	11,2	14	20,6
Examen microscopique						
Positif	128	57,7	94	61,8	33	48,5
Négatif	80	36,0	46	30,3	33	48,5
Inconnu	14	6,3	12	7,9	2	3,0
Résistance associée						
Ni SM ni EMB	83	37,4	61	40,2	22	32,4
SM seule	69	31,1	44	28,9	25	36,7
EMB seul	13	5,9	9	5,9	4	5,9
SM + EMB	57	25,6	38	25,0	17	25,0

Les informations sur les antécédents de traitement manquent pour deux malades.
VIH : virus de l'immunodéficience humaine ; SM : streptomycine ; EMB : éthambutol.

Pour en savoir plus

Grosset J, Trystram D, de Benoist AC, Schwoebel V, Vincent V, Gutierrez MC, et al. Surveillance de la tuberculose à bacilles multirésistants en France en 1995. Bull Epidémiol Hebd 1998 ; 1 : 53-4.

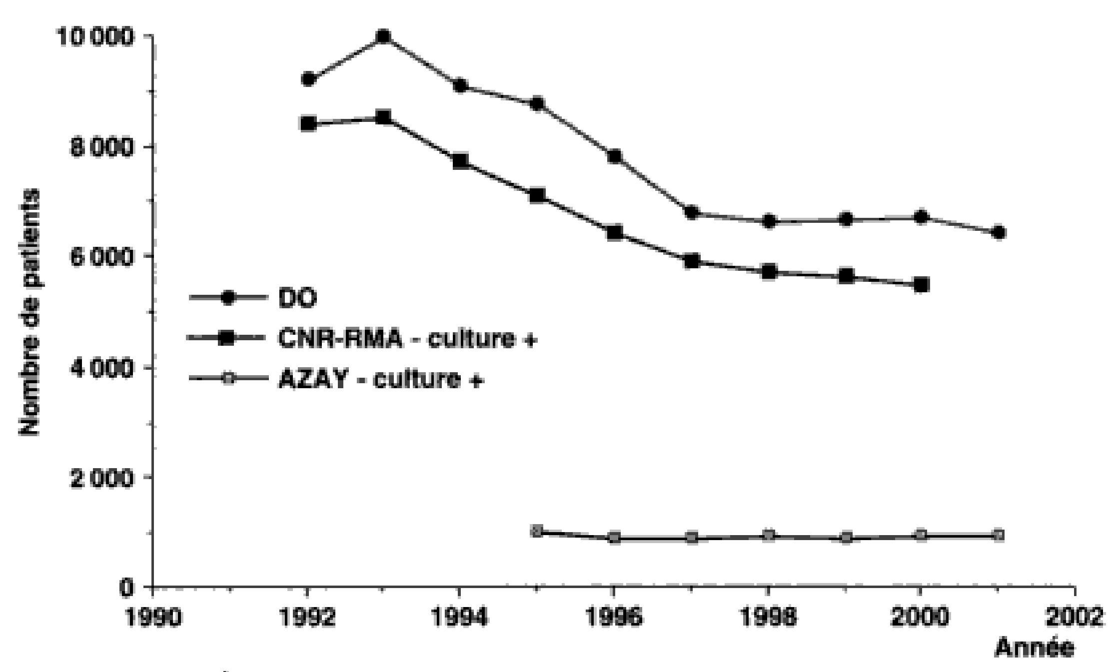


Figure 11.3. Évolution du nombre de cas de tuberculose selon le système de surveillance (DO : déclaration obligatoire ; AZAY : réseau AZAY-mycobactéries ; CNR-MDR : réseau des microbiologistes correspondants du CNR ; culture + : cas bactériologiquement confirmés).

Robert J, Trystram D, Truffot-Pernot C, Grosset J, Jarlier V. Surveillance de la tuberculose à bacilles multirésistants en France en 1996 et 1997. Bull Epidémiol Hebd 2000 ; 40 : 175-7.

Flament-Saillour M, Robert J, Jarlier V, Grosset J. Outcome of multidrug-resistant tuberculosis in France : a case-control study. Am J Respir Crit Care Med 1999 ; 160 : 587-93.

Robert J, Trystram D, Truffot-Pernot C, Carbonnelle B, Grosset J for the Azay Mycobacteria Study Group. Surveillance of *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in France, 1995-1997. Int J Tuberc Lung Dis 2000 ; 4 : 665-72.

Cailhol J, Che D, Campese C, Decludt B. Les cas de tuberculose déclarés en France en 2001. Bull Epidémiol Hebd 2003 ; 10-11 : 54-7.

EuroTB (InVS/KNCV) and the national coordinators for tuberculosis surveillance in the WHO European region. Surveillance of tuberculosis in Europe. Report on tuberculosis case notified in 1998. February 2001.

Espinal MA, Laszlo A, Simonsen L, Boulahbal F, Kim SJ, Reniero A, et al. for the World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on anti-tuberculosis drug resistance surveillance. Global trends in drug resistance to antituberculosis drugs. N Engl J Med 2001 ; 344 : 1294-303.

Remerciements

Nous remercions tous nos collègues microbiologistes grâce auxquels les informations présentées dans cette synthèse ont pu être réunies.

Liste des laboratoires du réseau AZAY-mycobactéries 1995–2001

G. Laurans (Amiens) E. Carpentier, B. Carbonnelle (coordonnateur) (Angers) ; G. Couetdic (Besançon) ; J. Texier-Maugein (Bordeaux) ; M.L. Abalain (Brest), B. Malbruny (Caen) ; L. Lebrun (Clamart) ; L. Deforges (Créteil) ; JM Duez (Dijon) C. Savage, A. Vachée (Lille) ; C. Martin (Limoges) M. de Montclos, M. Chomarat (Lyon-Sud) ; M.Drancourt, MJ. Gevaudan (Marseille) ; M. Dailloux (Nancy) ; P. Bemer-Melchior, D. Moinard (Nantes) ; D. Sicard (Nice) ; G. Agius, A. Bourgoin (Poitiers) ; L. Brasme (Reims) ; M. Nouvellon, M. Pestel-Caron (Rouen) ; R. Bauriaud (Toulouse) ; B. Cattier (Tours) ; D. Mathieu (Villejuif) ; J. Pierre, R. Ruimy (Paris-Bichat) ; S. Coignard (Paris-Hôtel-Dieu) ; C. Truffot-Pernot, E. Cambau (Paris-Pitié Salpêtrière) ; A. Buré-Rossier (Paris-Rothschild) ; V. Lalande (Paris-Saint-Antoine).

Mycobacterium tuberculosis et mycobactéries atypiques

Chapitre 12

Sécurité au laboratoire de mycobactéries

Marcelle Mounier, Caroline Debrock, Christian Martin,
Marie-Cécile Ploy, François Denis

Risque infectieux
Cadre réglementaire
Moyens de protection
Gestes de « routine »
Gestion des déchets

1.2. Mode de contamination

La contamination au laboratoire se fait essentiellement par voie aérienne par des aérosols de bacilles tuberculeux générés lors des manipulations de prélèvements de patients infectés ou de cultures positives. De nombreuses techniques de laboratoire produisent des aérosols. Si le tube brisé est une source d'exposition avérée que personne ne peut négliger, il n'en va pas toujours de même pour des manipulations banales comme l'agitation ou l'ouverture d'un tube, qui peuvent pourtant projeter des microgouttelettes dans l'atmosphère. De même, l'utilisation de centrifugeuses, de broyeurs, d'appareils à ultrasons sont des sources importantes d'aérosols d'autant plus à risque que leur diffusion est accélérée par ces techniques. Le flambage d'une öse ou d'un tube contenant une suspension liquide de mycobactéries peut disséminer des microparticules contaminantes par rupture du film liquide sous l'effet de la chaleur. Les cultures lyophilisées, mais aussi les résidus de cultures séchant sur des surfaces sont susceptibles d'émettre de petites particules lorsqu'ils sont grattés, filtrés...

De plus, la conscience du risque par le personnel est bien souvent inversée puisque, dans ce type de laboratoire, on cherche à protéger le prélèvement avant de se protéger soi-même.

2. Cadre réglementaire

Les mycobactéries sont des agents biologiques. Les textes réglementaires (nationaux et communautaires) classent les agents biologiques en quatre groupes en fonction de l'importance du risque d'infection qu'ils présentent pour une personne en bonne santé :

– le groupe 1 correspond aux agents biologiques qui ne sont pas susceptibles de provoquer une maladie chez l'homme ;

– le groupe 2 comprend les agents biologiques capables de provoquer une maladie chez l'homme et de constituer un danger pour le travailleur, mais leur propagation dans la collectivité est improbable et il existe généralement une prophylaxie ou un traitement efficace ;

– le groupe 3 inclut les agents biologiques pouvant provoquer une maladie grave chez l'homme et constituer un danger sérieux pour les travailleurs. Il existe un risque de propagation dans la collectivité mais il existe généralement une prophylaxie ou un traitement efficace ;

– le groupe 4 regroupe les agents biologiques capables de provoquer des maladies graves chez l'homme et constituant un danger sérieux pour les travailleurs. Ils peuvent présenter un risque important de propagation dans la collectivité et il n'existe généralement pas de prophylaxie ni de traitement efficace.

Les mycobactéries sont classées dans les groupes 3 et 2 des agents biologiques (Tableau 12.1).

La directive 2000/54/CE du Parlement européen et du Conseil de l'Union européenne du 18 septembre 2000 a aussi pour objet la protection des travailleurs contre les risques pour leur sécurité et leur santé résultant, ou susceptibles de résulter d'une exposition à des agents biologiques au travail.

Tableau 12.1
Classification des mycobactéries dans la classification communautaire des agents biologiques (extrait de la directive 2000/54/CE du 18 septembre 2000, annexe III)

Agent biologique	Groupe	Sigles symboles	Agent biologique	Groupe	Sigles symboles
Mycobacterium leprae	3		*Mycobacterium avium/intracellulare*	2	
Mycobacterium tuberculosis	3	V	*Mycobacterium chelonae*	2	
Mycobacterium bovis (à l'exception de la souche BCG)	3	V	*Mycobacterium fortuitum*	2	
Mycobacterium africanum	3	V	*Mycobacterium kansasii*	2	
Mycobacterium ulcerans	3*		*Mycobacterium malmoense*	2	
Mycobacterium microti	3*		*Mycobacterium marinum*	2	
			Mycobacterium paratuberculosis	2	
			Mycobacterium simiae	2	
			Mycobacterium szulgai	2	
			Mycobacterium scrofulaceum	2	
			Mycobacterium xenopi	2	

V : vaccin efficace disponible.
*Certains agents biologiques classés dans le groupe 3 et indiqués dans la liste ci-jointe par un astérisque peuvent présenter pour les travailleurs un risque d'infection limité parce qu'ils ne sont normalement pas infectieux par l'air.

La prévention de ces risques est également abordée dans cette directive. L'article 8 de ce texte liste les mesures d'hygiène et de protection individuelle (Fig. 12.1). En France, l'arrêté du 13 août 1996, qui précise les mesures de confinement à mettre en œuvre pour les travailleurs qui sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques, concerne seulement les industries et les laboratoires de recherche et d'enseignement et pas les laboratoires d'analyses médicales pour lesquels un arrêté serait en cours de préparation. Dans cet arrêté de 1996, le niveau de confinement correspond à la classification des agents biologiques dans les groupes 2 à 4, il n'y a pas de mesures de confinement pour le groupe 1 (Tableau 12.2A). La directive européenne 2000/54/CE

Mesures d'hygiène et de protection individuelle

L'employeur est tenu, pour toutes les activités mettant en jeu des agents biologiques qui constituent un risque pour la sécurité ou la santé des travailleurs, de prendre des mesures appropriées aux fins suivantes :
a) faire en sorte que les travailleurs ne mangent ni ne boivent dans les zones de travail où existe un risque de contamination par des agents biologiques ;
b) fournir aux travailleurs des vêtements de protection appropriés ou d'autres vêtements particuliers appropriés ;
c) mettre à la disposition des travailleurs des salles d'eau et des sanitaires appropriés et adéquats, pouvant comprendre des gouttes pour les yeux et/ou des antiseptiques pour la peau :
d) faire en sorte que tout équipement de protection nécessaire soit :
– placé correctement dans un endroit déterminé ;
– vérifié et nettoyé si possible avant et, en tout cas, après chaque utilisation ;
– réparé ou remplacé avant une nouvelle utilisation, s'il est défectueux ;
e) mettre au point des procédures concernant la prise, la manipulation et le traitement d'échantillons d'origine humaine ou animale.
Les vêtements de travail et les équipements de protection, y compris les vêtements de protection visés au paragraphe 1, qui peuvent être contaminés par des agents biologiques doivent être enlevés lorsque le travailleur quitte la zone de travail et, avant que les mesures prévues au second alinéa ne soient prises, rangés à l'écart des autres vêtements.
L'employeur doit veiller à ce que ces vêtements et ces équipements de protection soient désinfectés et nettoyés ou, au besoin, détruits.
Il n'est pas permis d'imputer aux travailleurs le coût des mesures prises en application des paragraphes 1 et 2.

Figure 12.1. Article 8 de la directive 2000/54/CE du Parlement européen et du Conseil de l'Union européenne du 18 septembre 2000 concernant la protection des travailleurs contre les risques biologiques au travail.

du 18 septembre 2000 précise dans son article 16 sur « les mesures spéciales applicables aux procédés industriels, aux laboratoires et aux locaux animaliers » les mesures de confinement devant s'appliquer à la mise en œuvre industrielle de ces agents biologiques. Ces mesures sont rapportées dans le Tableau 12.2B.

3. Moyens de protection

3.1. Hygiène de base

Il est interdit de boire, manger ou fumer dans le laboratoire.
Une tenue remplace les vêtements de ville, elle est couvrante et spécifique au laboratoire des mycobactéries, à usage unique ou changée chaque jour (exemple : tunique pantalon ou blouse pantalon). Les mains et les poignets sont nus (pas de bagues, montres, bracelets...) pour faciliter le lavage des mains qui, suivant les circonstances, sera simple (savon doux) ou hygiénique

Tableau 12.2A
Mesures de confinement. Arrêté du 13 août 1996, annexe 1

Mesures de confinement	Niveaux de confinement		
	2	3	4
Conception du laboratoire			
Signalisation du laboratoire (pictogramme « danger biologique »)	Oui	Oui	Oui
Laboratoire séparé des autres locaux au moins par une porte	Oui	Oui	Oui
Accès au laboratoire via un sas	Non	Optionnel (oui si en pression négative)	Oui
Accès réglementé verrouillable. Accès possible pour les seuls travailleurs autorisés	Oui	Oui	Oui, par un sas
Possibilité de fermer hermétiquement le lieu de travail pour permettre la désinfection (fumigation)	Optionnel	Oui	Oui
Filtration de l'air extrait du lieu de travail (filtre HEPA) avec évacuation de l'air extérieur	Non	Oui	Oui, double filtre HEPA
Filtration de l'air entrant dans le lieu de travail	Non	Optionnel	Oui
Présence d'une fenêtre d'observation ou d'un système équivalent permettant de voir les occupants	Non	Oui	Oui
Moyen de communication avec l'extérieur	Non	Optionnel	Oui
Maintien d'une pression négative dans le laboratoire par rapport aux zones voisines	Non	Oui (1)	Oui
Système d'alarme pour détecter tout changement inacceptable de la pression de l'air	Non	Oui, si mise en dépression	Oui
Approvisionnement en énergie électrique de secours	Non	Optionnel	Oui
Système de ventilation de secours	Non	Non	Oui
Aménagements internes			
Poste de sécurité microbiologique	Oui (2)	Oui (2)	Oui type III ou autre moyen équivalent
Vêtement de protection	Oui	Vêtements de protection adapté et surbottes	Change complet avant l'entrée ou la sortie du laboratoire

(Suite)

Tableau 12.2B
Confinement pour les procédés industriels (directive 2000/54/CE)

Mesures de confinement	Niveaux de confinement industriel		
	2	3	4
1 - Les microorganismes viables doivent être confinés dans un système qui sépare physiquement l'opération de l'environnement	Oui	Oui	Oui
2 - Les gaz qui s'échappent du système fermé doivent être traités de manière à :	Réduire au minimum la dissémination	Éviter la dissémination	Éviter la dissémination
3 - Le prélèvement d'échantillon, l'apport de substances à un système fermé et le transfert de microorganismes viables à un autre système fermé doivent être effectués de manière à :	Réduire au minimum la dissémination	Éviter la dissémination	Éviter la dissémination
4 - Les fluides de culture ne doivent pas être retirés du système fermé, à moins que les microorganismes viables n'aient été	Inactivés par des moyens éprouvés	Inactivés par des moyens chimiques ou physiques éprouvés	Inactivés par des moyens chimiques ou physiques éprouvés
5 - Les fermetures hermétiques doivent être situées dans une zone contrôlée	Facultatif	Facultatif	Oui, et construite à cet effet
a) Des avertissements concernant les risques biologiques doivent être placés	Facultatif	Oui	Oui
b) L'accès doit être réservé au seul personnel désigné	Facultatif	Oui	Oui, par un sas
c) Le personnel doit porter des vêtements de protection	Oui, des vêtements de travail	Oui	Se changer complètement
d) Le personnel doit avoir accès à des installations de décontamination et à des installations sanitaires	Oui	Oui	Oui

(Suite)

Tableau 12.2B ***(suite)***

Mesures de confinement	Niveaux de confinement industriel		
	2	3	4
e) Le personnel doit prendre une douche avant de quitter la zone contrôlée	Non	Facultatif	Oui
f) Les effluents des éviers et des douches doivent être collectés et inactivés avant d'être rejetés	Non	Facultatif	Oui
g) La zone contrôlée doit être convenablement ventilée en vue de réduire au minimum la contamination de l'air	Facultatif	Facultatif	Oui
h) La zone contrôlée doit être maintenue à une pression inférieure à la pression atmosphérique	Non	Facultatif	Oui
i) L'air qui entre dans la zone contrôlée et celui qui en sort doivent être filtrés par un filtre HEPA	Non	Facultatif	Oui
j) La zone contrôlée doit être conçue de manière à ce que tout le contenu du système puisse être retenu en cas de déversement	Non	Facultatif	Oui
k) La zone contrôlée doit pouvoir être fermée hermétiquement de manière à permettre les fumigations	Non	Facultatif	Oui
l) Traitement des effluents avant l'évacuation finale	Inactivés par des moyens éprouvés	Inactivés par des moyens chimiques ou physiques éprouvés	Inactivés par des moyens chimiques ou physiques éprouvés

Agents biologiques du groupe 1 : pour les activités comportant l'emploi d'agents biologiques du groupe 1, y compris les vaccins vivants atténués, les principes de bonne sécurité et de bonne hygiène du travail doivent être respectés.
Agents biologiques des groupes 2, 3 et 4 : il peut être utile de sélectionner et de combiner les exigences de confinement des différentes catégories figurant ci-dessus sur la base d'une évaluation des risques liés à un procédé particulier ou à une partie d'un procédé.

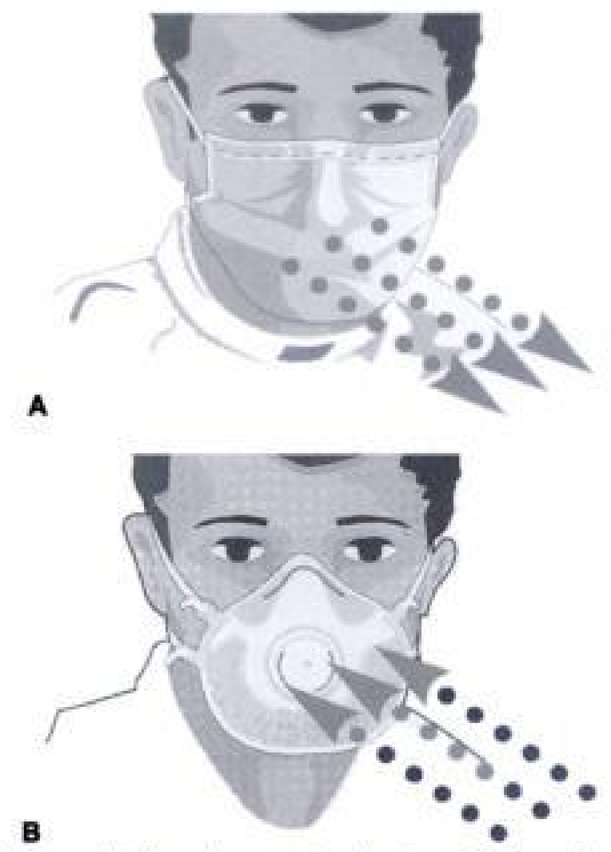


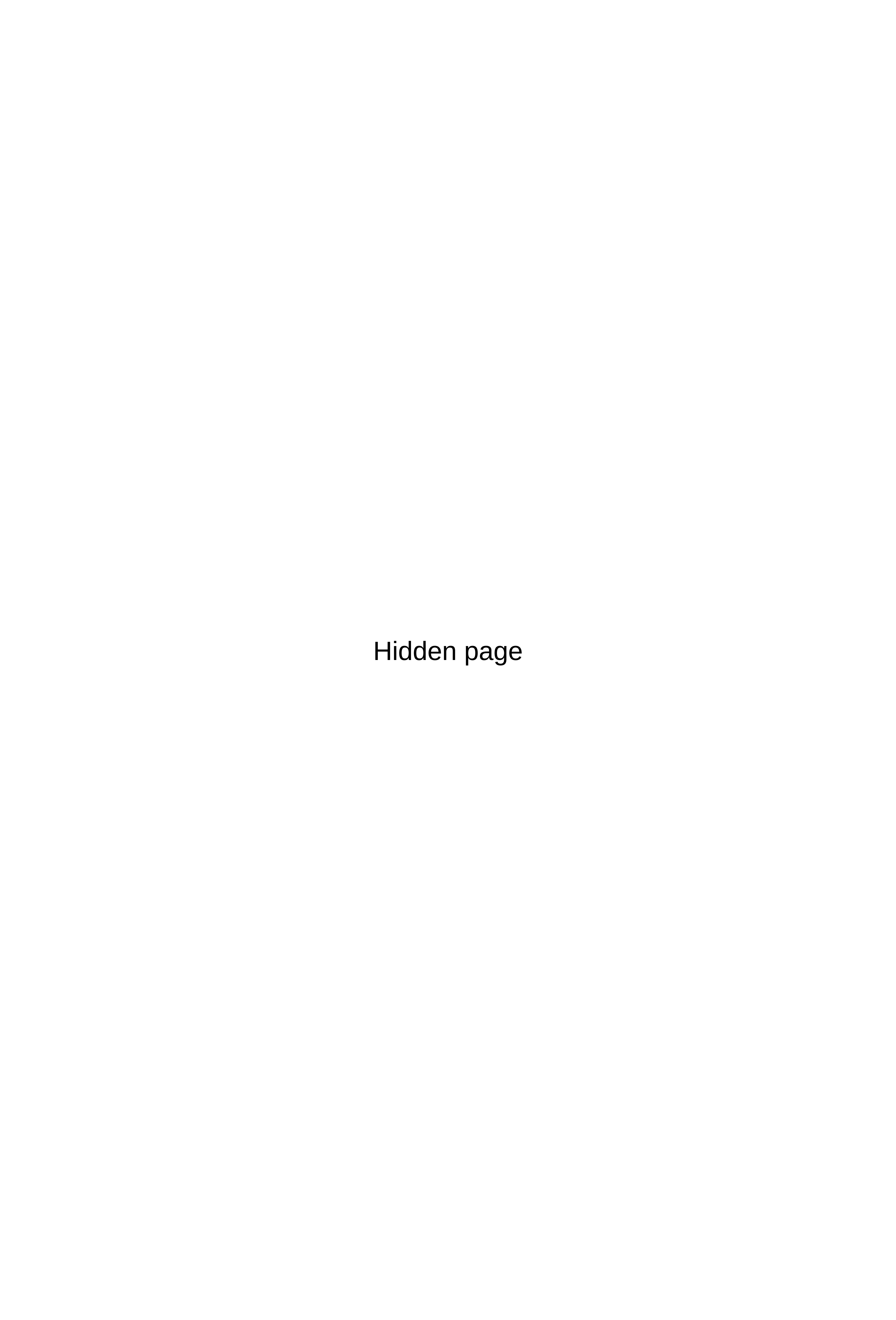
Figure 12.2. A. Masque médical pour la protection du patient. **B.** Masque de protection respiratoire pour la protection du soignant (d'après la fiche-sécurité INBS-ED10S).

Tableau 12.3
Performances des masques de protection respiratoire

Désignation du masque	Pénétration du filtre	Fuite totale du masque
FFP1	< 20 %	< 22 %
FFP2	< 6 %	< 8 %
FFP3	< 0,05 %	< 2 %



Figure 12.3. Schéma de la mise en place du masque de protection respiratoire.


Hidden page

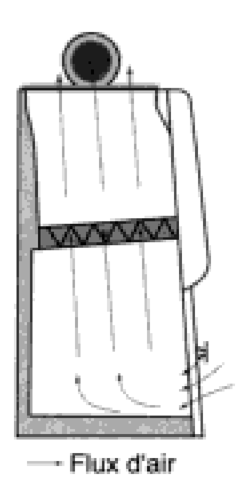


Figure 12.6. PSM I.
Ce flux assure la protection de l'opérateur par écoulement d'air vers l'enceinte placée en dépression.

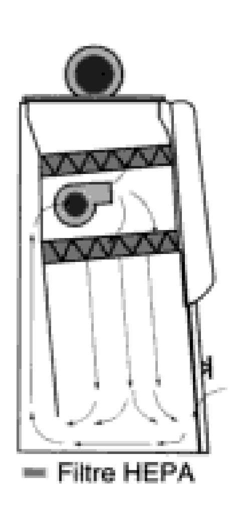


Figure 12.7. PSM II.
Le flux d'air filtré est orienté vers le produit manipulé. L'air, puisé dans l'ambiance de travail (veine de garde), est acheminé vers le plenum soit directement (PSM II A), soit après passage au travers d'un filtre HEPA (PSM II B).

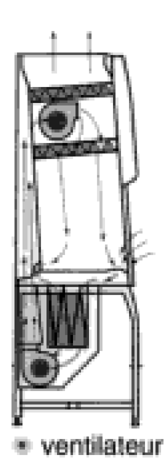


Figure 12.8. PSM III.
L'air entrant dans le PSM III est filtré de même que l'air extrait. Ce type de PSM est obligatoire pour les manipulations des agents biologiques du groupe 4.

Un PSM I permet de protéger le manipulateur et l'environnement. Un PSM II permet en plus de protéger la manipulation contre les « polluants » présents dans le laboratoire (Fig. 12.6, 12.7 et 12.8).

3.3.3. Comment utiliser un PSM II

La zone où est installé le PSM doit être protégée au maximum vis-à-vis des perturbations de l'air (porte, fenêtre, chemin de passage...). Il est impératif de

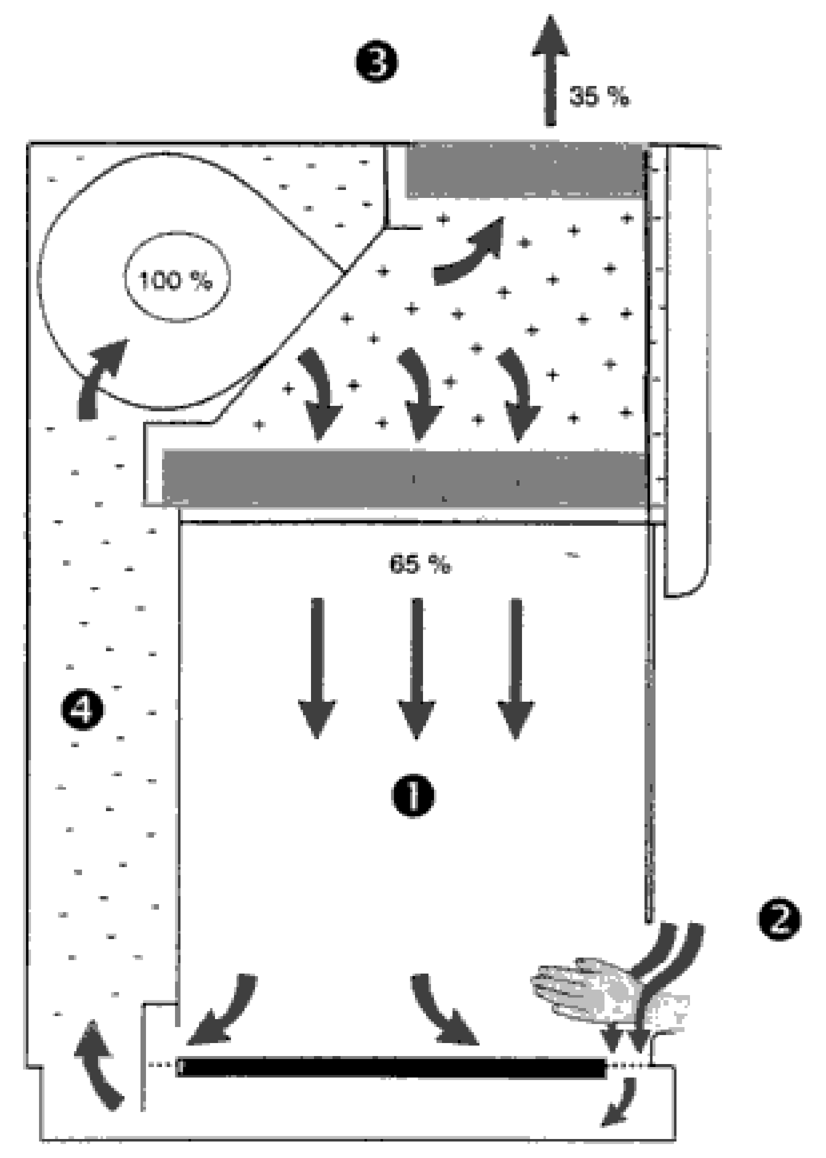


Figure 12.9. Schéma de fonctionnement d'un PSM II A.
Le flux d'air qui arrive sur le plan de travail est « laminaire », la filtration sur filtre HEPA assure la *protection de la manipulation.* (1) Apport d'air neuf par la façade participe à la création d'une barrière aéraulique (veine de garde) qui assure la *protection du manipulateur.* (2) Cette barrière peut être compromise par les turbulences générées par le manipulateur ou l'encombrement excessif du plan de travail. Une quantité d'air égale à celle qui forme la veine de garde est évacuée hors de l'enceinte après filtration sur filtre HEPA : *protection de l'environnement* (3). Le flux est repris dans les bandeaux d'aspiration (4) du plan de travail puis soufflé dans le plenum de répartition et dirigé en partie vers le filtre de rejet et en partie vers la chambre de manipulation (recyclage).

L'emploi d'une source de chaleur dans la hotte est interdite (perturbation du flux et altération des filtres).
Ne pas effectuer de mouvements rapides à l'intérieur de la hotte pendant le fonctionnement (risque de rupture de la veine de garde).
Ne pas projeter de liquide ou de solide sur la face du filtre. De même, ne pas accrocher ou suspendre d'objets sur les grilles de soufflage.
L'utilisation d'une flamme (type bec Bunzen) est fortement déconseillée dans un PSM (perturbation du flux, risque d'altération du filtre...).

3.3.4.4. Fin de manipulation

Retirer tout le matériel de la hotte.
Laisser la hotte fonctionner en régime de travail au moins dix minutes avant la mise en régime de veille ou l'arrêt.

3.3.4.5. Écrire les procédures, les respecter, les évaluer.

4. Gestes de « routine »

L'enceinte de sécurité (PSM) doit être utilisée pour toutes les manipulations, qu'il s'agisse du produit pathologique, des cultures, des souches ou des manipulations conduisant à l'identification et l'antibiogramme ; toutefois, cette précaution indispensable ne dispense pas du respect des règles de base de manipulation des produits pathologiques dont les principales sont listées dans le Tableau 12.4.

5. Gestion des déchets

« L'élimination des déchets doit être conforme à la législation et à la réglementation en vigueur. Elle doit être conduite de manière à respecter la réglementation et à ne pas compromettre la santé du personnel du laboratoire ni celui chargé de la collecte des déchets et à ne pas polluer l'environnement (GBEA annexe II-6-1) ».
La loi 75-633 du 15 juillet 1975 modifiée, relative à l'élimination des déchets, rend responsable le producteur de ses déchets tout au long de la filière d'élimination, c'est-à-dire du tri jusqu'au traitement terminal en passant par l'entreposage, la collecte et le transport. Le décret 97-1048 du 6 novembre 1997 confirme ces obligations en les précisant.
Les déchets de laboratoire sont assimilés aux déchets d'activité de soins à risque infectieux (DASRI) et répondent à l'obligation de désinfection ou d'incinération de tous les déchets contaminés. Ils sont soumis à des conditions de transport strictes (arrêté dit ADR) communes à toutes les réglementations pour les transports des marchandises dangereuses (TMD) par chemin de fer, par route ou par voie de navigation intérieure où les matières infectieuses sont classées dans la classe 6–2, suivant la classification à 13 classes de danger. La grande majorité des DASRI y est classée sous le chiffre 4°b (code ONU 3291, déchets d'hôpital non spécifiés). Les déchets qui relèvent des groupes

Tableau 12.4
Présentation schématique de quelques risques associés à des gestes « de routine » et aux mesures préventives à mettre en œuvre

Geste	Risque	Prévention
Réception des prélèvements	Mauvaise condition de conditionnement et de transport : fuites, bris...	Prévoir des conditionnements adaptés Zone de réception spécifique Tenue adaptée (au minimum des gants) Lavage des mains régulier : prévoir un poste de lavage des mains dans cette zone
Pipeter Rappel : il est interdit de pipeter à la bouche	Aérosol si présence d'air dans la pipette	Ne pas expulser violemment le liquide hors de la pipette Ne jamais flamber une pipette avec du liquide à l'intérieur (NB : l'utilisation d'une flamme est proscrite dans un PSM)
Ouverture de tubes, boîtes de Pétri....	L'humidité générée par la culture peut entraîner un aérosol au moment de l'ouverture	Ouvrir impérativement dans l'enceinte de sécurité (PSM II)
Centrifugation	Risque d'aérosol : la vitesse augmente la dispersion d'un aérosol et le rend d'autant plus dangereux Risque de tube cassé	Centrifuger dans des plots parfaitement clos, facilement nettoyables, voire autoclavables S'assurer de l'équilibrage de la centrifugeuse pour éviter le risque de tubes cassés
Homogénéisation, vortex	Risque d'aérosol	Utiliser des tubes hermétiquement clos (à vis) Laisser reposer avant d'ouvrir Ouvrir dans une enceinte de sécurité (PSM II)
Manipulation des prélèvements solides (biopsie, fragments de pièces chirurgicales...)	Risque de coupures (scalpel, ciseaux...)	Porter des gants Connaître la procédure applicable aux blessures et aux accidents d'exposition au sang (AES)
Ensemencements, manipulation des cultures	Aérosol Bris de pipette (coupure)	Travailler dans le PSM II Utiliser du petit matériel plastique à usage unique (anses, râteaux)
Envoi de souches ou de produits biologiques	Détérioration de l'emballage Contamination des « civils »	Emballage conforme aux normes de la classe 6-2 de l'ONU* (Fig. 12.10)

*Réglementation relative au transport par route des matières dangereuses : arrêté du 5 décembre 1996 modifié dit « ADR ».

de risques 3 et 4 (les mycobactéries tuberculeuses relèvent, rappelons-le, du groupe 3) sont à classer respectivement sous les chiffres 2° et 1° de la classe 6–2, ce qui implique des conditions d'emballage (Fig. 12.10) et de transport bien plus contraignantes que pour les déchets classés sous 4°b. Le ministère chargé de la santé préconise un autoclavage de ces déchets pour diminuer le risque infectieux (sans toutefois le supprimer) et pour classer ces déchets sous 4°b. Lorsque l'emballage est autoclavé avec son contenu, il devra être suremballé dans un emballage conforme aux exigences réglementaires en vigueur pour les matières du 4°b de la classe 6–2 avec en particulier le symbole graphique de « risque biologique » de dimensions extérieures minimales de 20 mm × 20 mm (Fig. 12.11).
Les emballages pour DASRI sont de couleur jaune, étanches, à usage unique et sont soit conformes à la réglementation des transports, soit suremballés dans des récipients conformes à cette réglementation. Les déchets perforants sont à éliminer dans des conteneurs rigides (norme Afnor NF X30-500) même s'ils n'ont pas été mis en contact avec un produit biologique (aiguille, pipette, matériel en verre, flacons, lames...). Les déchets mous sont à éliminer dans des emballages spécifiques répondant à la norme Afnor X30-501. Le compactage est interdit. L'évacuation des déchets solides se fait par des circuits spécifiques. Il n'y a pas pour le moment de réglementation pour les effluents liquides.

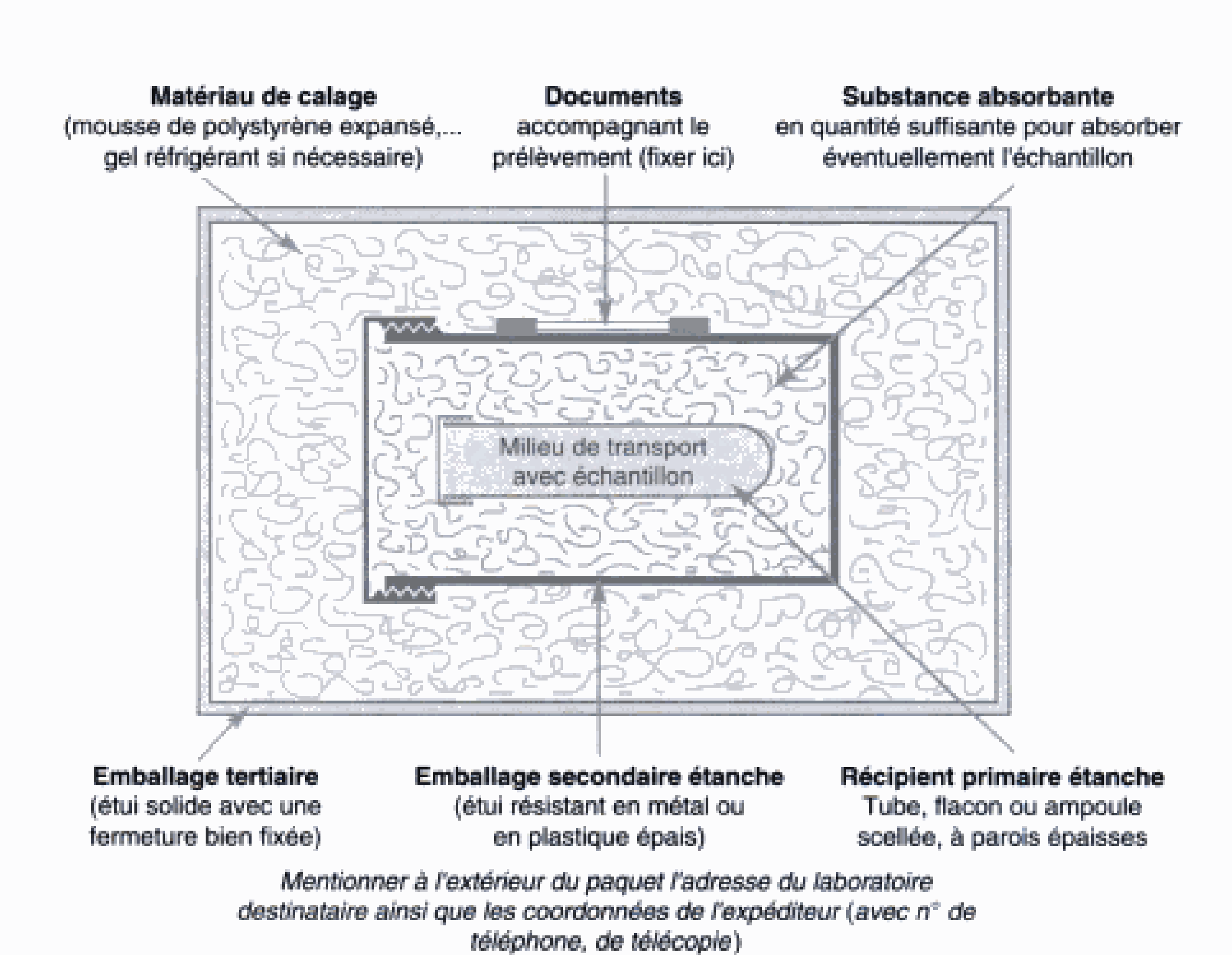


Figure 12.10. Schéma d'un triple emballage suivant les normes de la classe 6–2 de l'Onu.



Figure 12.11. Symbole graphique du risque biologique.

Les rejets de solvants et de produits toxiques doit se faire dans des bidons identifiés et évacués par une filière spécifique. De même, les produits mutagènes (diméthylformamide, NBT : nitro blue de tétrazolium...) ou ceux contenant des substances mutagènes (gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium) doivent aussi être traités suivant une procédure spécifique.
NB : la manipulation des produits radioactifs est soumise à une réglementation spécifique (autorisation de détention et d'utilisation de telles substances) et la filière l'élimination de ces déchets est rigoureusement contrôlée.

6. Conclusion

Au total, la sécurité des laboratoires de bactériologie en général et de mycobactériologie tout particulièrement ne peut jamais être totale. Un certain nombre de recommandations doit être respecté tenant aux locaux, aux équipements et aux actes eux-mêmes. Il est indispensable d'examiner avec un œil critique toutes les étapes de la chaîne, allant du prélèvement à l'étude et à la conservation des souches jusqu'à l'évacuation et au traitement des déchets.
L'information et la formation continue du personnel technique et d'encadrement constitue un préalable indispensable à la connaissance et à la maîtrise du risque.
Rappelons que le personnel travaillant dans le secteur des mycobactéries doit faire l'objet d'une surveillance particulière de la part de la médecine du travail.
Enfin, il ne suffit pas de redoubler d'attention lors de l'installation ou de la mise en place des techniques et d'écrire les procédures, encore faut-il éviter les dérives spontanées insidieuses, parfois dangereuses, en les recherchant lors d'audits réguliers internes ou externes.

Pour en savoir plus

Balty I, Bayeux Mc, Abiteboul D. Prévention de la tuberculose chez les soignants : choix des masques. In : Bouvet E, Regnier B, Vildé JL, Yeni P, Eds. Tuberculose : une maladie toujours d'actualité. Paris : EDK ; 2002.

Cailhol J, Che D, Campese C, Decludt B. Les cas de tuberculose déclarées en France en 2001. Bull Epidémiol Hebd 2003 ; 10 : 54-7.

Collins C, Grange J, Yates M. Tuberculosis bacteriology. 2e ed. Butterworth-Heinemann ; 1997. p. 26-40.

Hidden page

Une fois reconstitué sous forme liquide, sa durée de conservation est limitée (deux à huit heures). Il est sensible à la lumière et doit être maintenu à l'obscurité.
Le site recommandé est la partie postéro-extérieure du bras, à l'union du tiers moyen et tiers supérieur (à gauche de préférence). La technique d'administration percutanée par scarification ou multiples piqûres (bague) est plus simple et plus rapide que l'injection intradermique, mais ne permet pas de déterminer la dose réellement administrée. Quelle que soit la technique utilisée, la vaccination induit une réponse immunitaire du sujet et le développement d'une cicatrice. Une papule indurée apparaît dans les deux à quatre semaines qui suivent l'injection intradermique, suivie d'une pustule qui évolue en six à huit semaines et qui guérit durant le troisième mois, laissant une cicatrice au point d'injection.

4. Contrôle de la réponse vaccinale

Ce contrôle s'effectue à l'aide d'un test cutané à la tuberculine ou intradermoréaction (IDR). Il apprécie l'hypersensibilité retardée induite par le vaccin. On recommande une intradermoréaction par injection de 0,1 ml de 5 unités de tuberculine de PPD-S (S pour Seibert) ou de 10 UI de tuberculine IP-Mérieux, qui sont l'équivalent biologique de 5 UI de tuberculine PPD-S. Le résultat est lu à 72 heures, exprimé en millimètres du plus grand diamètre de l'induration (et non de l'érythème). Le premier contrôle est effectué au moins trois mois après la vaccination dans la première année. Le diamètre est normalement positif entre 7 et 12 mm, mais la réaction est considérée généralement comme positive si le diamètre est supérieur ou égal à 5 mm. Selon Grenier, toute induration palpable dont le diamètre transversal est égal ou supérieur à 10 mm est considérée comme réponse positive, négative si le diamètre est inférieur à 5 mm, non significative entre 5 et 9 mm. Les IDR sont plus fréquemment positives après vaccination par voie intradermique que par multipuncture ; de même, les réactions positives persistent plus longtemps après la première technique. Certains préfèrent tester cette immunité par méthode percutanée (Monotest®) plus facile à utiliser chez le petit enfant. Cette voie n'utilise que 5 UI et donne des résultats plus difficiles à quantifier qu'avec l'IDR classique. À noter que les timbres tuberculiniques ne sont plus commercialisés.

5. Contre-indications et effets indésirables du BCG

Les contre-indications sont celles inhérentes à tous les vaccins à germes vivants.
Le risque d'une infection généralisée par le BCG chez des enfants présentant un déficit congénital de l'immunité n'est pas quantifié de manière précise. Le BCG n'est pas recommandé pour les enfants infectés par le VIH, qu'ils soient ou non symptomatiques, et ces enfants sont dégagés de l'obligation vaccinale.
La fréquence des incidents et accidents postvaccinaux est relativement faible.
Le plus souvent, on n'observe pas d'élévation thermique ni de modification de l'état général à la suite de la vaccination, le seul stigmate étant la cicatrice gaufrée dépigmentée au point d'injection.

Une adénite inflammatoire dans le territoire ganglionnaire correspondant au site de vaccination apparaît parfois, avec une fréquence variant avec l'âge du vacciné, l'expérience du vaccinateur, et est parfois liée à une dilution insuffisante de la souche vaccinale. On estime en général que la fréquence de cette adénite se situe entre 1 pour mille et 4,3 pour cent, mais d'autres auteurs avancent des taux de 6 à 12 %. On considère qu'une fréquence d'adénopathies postvaccinales au-dessus de 0,5 % doit faire soupçonner une technique inappropriée. Cette adénite disparaît en quelques semaines. Certains enfants (0,1 %), le plus souvent de moins de deux ans, présentent une adénite suppurée qui peut se prolonger, voire se fistuliser. Ces adénites peuvent nécessiter une incision et un traitement antibiotique.
Les autres complications sont exceptionnelles, telles que :
– lupus au site d'injection (1/200 000 enfants) ;
– ostéite à BCG (1/1 000 000 d'enfants) ; elles se développent entre quatre mois et douze ans après la vaccination. Les épiphyses des os longs sont les plus touchées.
La BCGite généralisée révèle un trouble grave de l'immunité. Cette complication est très sérieuse, parfois mortelle. Elle se retrouve chez les sujets présentant des immunodéficiences, des anomalies des macrophages, des fonctions des lymphocytes T et du récepteur à l'interféron. Si la fréquence réelle de ces complications est très supérieure à l'estimation fournie par les données concernant les cas rapportés (une centaine de cas pour environ trois milliards d'enfants vaccinés), ces formes restent rares. De même, si la vaccination par le BCG est déconseillée chez les enfants infectés par le VIH, il faut noter que la plupart du temps, chez ces sujets, la vaccination entraîne des incidents mineurs, essentiellement des adénopathies, sans généralisation de l'infection par le BCG.

6. Calendrier vaccinal BCG jusqu'en 2003

En France, l'obligation vaccinale repose sur la loi du 5 janvier 1950. Les modalités vaccinales ont été modifiées par un décret et un arrêté en date du 5 septembre 1996. La vaccination par le BCG précoce (dès le premier mois de vie) est réservée aux enfants vivant dans un milieu à risque, mais doit être pratiquée en tout état de cause avant l'entrée en collectivité soit, de par l'obligation de scolarisation à six ans, avant cet âge. Dans les faits, la socialisation précoce des nourrissons français induit une vaccination BCG précoce. La mesure de la couverture vaccinale réalisée à partir des certificats de santé du 24ᵉ mois montre que, chaque année, entre 80 et 85 % des enfants sont vaccinés par le BCG à deux ans. La couverture vaccinale à six ans est de 95 %. Dans les suites de la primovaccination, une épreuve tuberculinique doit être pratiquée trois à douze mois plus tard. Si ce test est négatif, l'enfant doit être revacciné. Depuis 1996, si le résultat du premier test tuberculinique postvaccinal est positif, il n'y a pas lieu d'effectuer de nouveau test avant l'âge de 11–13 ans. À cet âge, un nouveau test est effectué par IDR et les sujets négatifs doivent être revaccinés. En cas de persistance de l'absence d'allergie tuberculinique, les sujets sont considérés comme ayant souscrit à l'obligation vaccinale après deux BCG effectués par voie intradermique, quel que soit le résultat du test tuberculinique.

L'obligation vaccinale concerne également certaines professions qui doivent être revaccinées en cas de réactions tuberculiniques négatives :
– les étudiants se préparant en médecine et en art dentaire, les élèves des écoles d'infirmiers, d'infirmières, d'assistants, d'assistantes sociales ou de sage-femmes ;
– les personnels des établissements hospitaliers publics et privés ;
– les personnels des administrations publiques ;
– les militaires des armées de terre, de mer et de l'air ;
– les personnels des entreprises industrielles et commerciales, et particulièrement les personnes travaillant dans un milieu insalubre ou qui manipulent des denrées alimentaires.

7. Justifications de la suppression de la revaccination et des tests tuberculiniques en 2003

L'intérêt des revaccinations est très discuté et l'OMS a publié en 1995 une synthèse de la littérature sur la question. Les conclusions en étaient que « chez les sujets vaccinés par le BCG, la revaccination n'est pas recommandée et aucun résultat scientifique ne confirme l'utilité de cette pratique. Les revaccinations multiples ne sont jamais indiquées... ». L'institut de veille sanitaire (InVS) a publié en 2001 un document sur l'impact épidémiologique de la vaccination BCG qui concluait également en faveur de la suppression de la revaccination BCG. La principale justification de ces conclusions vient de l'absence de données attestant son efficacité. Les résultats des études menées au Chili et au Malawi plaident en défaveur de l'efficacité de la revaccination. Les seules données en faveur d'un certain impact épidémiologique de la revaccination sont des données d'observation en provenance de Hongrie et de Pologne, sans groupe témoin et donc considérées comme peu concluantes. L'expérience finlandaise d'interruption de la revaccination des sujets se révélant tuberculinonégatifs à l'issue d'un contrôle effectué entre 11 et 13 ans vient conforter cette conclusion : cette décision n'a eu aucun impact négatif sur l'incidence de la tuberculose. Enfin, une très récente étude menée à Hong Kong, où les enfants sont vaccinés systématiquement à la naissance, a conclu à l'absence de différence, en termes de risque de développer une tuberculose, entre les enfants, selon qu'ils avaient ou non participé au programme de revaccination mené à l'école primaire.

De plus, le dogme consistant à baser la décision de revaccination sur l'intensité de la réaction tuberculinique ne repose pas sur des données scientifiques validées. Les données chez l'homme sont en faveur de l'absence de lien entre réaction tuberculinique et protection vaccinale. Cette conclusion s'appuie en particulier sur les données de l'essai anglais du Medical Research Council mené pendant 20 ans à partir de 1950 et qui fait autorité en matière d'étude d'efficacité du BCG. En France, l'enquête menée par l'Institut Pasteur de Lille de 1948 à 1971 a également abouti à la conclusion de l'absence d'association entre allergie postvaccinale et protection clinique. Comme le souligne l'OMS, « il convient de mettre fin à la pratique qui consiste à fonder la décision de revacciner un sujet par le BCG sur la réaction cutanée à la tuberculine... ». Enfin, dans son analyse, l'InVS concluait à un impact pratiquement

nul de la revaccination sur l'incidence des méningites et des miliaires tuberculeuses : même dans l'hypothèse hautement improbable d'une combinaison d'une efficacité globale du BCG de 50 % contre l'ensemble des formes de tuberculose et d'une efficacité de deux doses de BCG de 70 %, seule une dizaine de cas de tuberculose additionnels, toutes formes confondues, serait induite chaque année par la cessation de la revaccination.

Ces différents éléments ont conduit le conseil supérieur d'hygiène publique de France à recommander au ministère en charge de la santé, sur proposition du comité technique des vaccinations, la suppression des revaccinations des enfants ainsi que celle des adultes soumis à une obligation vaccinale professionnelle. Cette proposition était accompagnée d'une seconde recommandation concernant la suppression, chez l'enfant, des tests tuberculiniques postvaccinaux de routine. En effet, ces tests ne présentent plus d'intérêt dans le cadre de la suppression de la revaccination et leur maintien aurait mis les médecins dans la situation très inconfortable de détecter des sujets tuberculinonégatifs sans pouvoir les revacciner. Il n'a pas été jugé utile de maintenir un test tuberculinique postvaccinal de référence, comme aide à l'interprétation d'un test tuberculinique effectué ultérieurement dans le cadre de l'investigation autour d'un cas de tuberculose. En effet, en pratique, la connaissance de l'allergie tuberculinique ancienne est très peu contributive au diagnostic d'infection tuberculeuse et à la décision de prescription d'une chimioprophylaxie chez un enfant au contact d'un cas de tuberculose bacillifère. Bien entendu, les tests tuberculiniques effectués par IDR dans le cadre de l'investigation autour d'un cas gardent toute leur importance et voient même leur intérêt augmenté par la grande facilité d'interprétation qui résultera de l'interruption de la revaccination. Les tests tuberculiniques prévaccinaux ne sont pas non plus concernés par cette modification de la politique.

8. Efficacité du BCG contre la tuberculose

Dans la partie concernant l'historique de la vaccination antituberculeuse, on a pu constater que la communauté scientifique s'est engagée prudemment dans la vaccination du fait de craintes concernant l'innocuité (que nous avons passé en revue), mais aussi l'efficacité, certains ayant rebaptisé « BCG, *better go cautiously* », c'est-à-dire « mieux vaut y aller prudemment ».

Les évaluations concernant le BCG ont commencé durant la décennie 1930 et les résultats obtenus jusque durant les années 1970 étaient très hétérogènes, allant d'une efficacité négative (qui correspondrait en théorie à un effet favorisant du BCG sur le risque de tuberculose) à une efficacité de 80 % (Fig. 13.2). À la suite de la grande enquête menée à Chingleput en Inde, dans les années 1970, qui devait servir d'étude de référence et qui avait conclu à l'inefficacité du BCG, de nombreuses études ont été réalisées, portant en particulier sur la protection conférée par une vaccination BCG précoce contre la tuberculose de l'enfant. Deux méta-analyses publiées au début des années 1990 ont permis de confirmer l'efficacité du BCG dans la prévention des méningites et des miliaires tuberculeuses de l'enfant, avec un pouvoir protecteur estimé entre 64 % et 86 % selon le type d'analyse. En revanche, les estimations de l'efficacité du BCG contre les formes pulmonaires étaient plus hétérogènes. Une troisième méta-analyse, n'ayant inclus que les études ayant

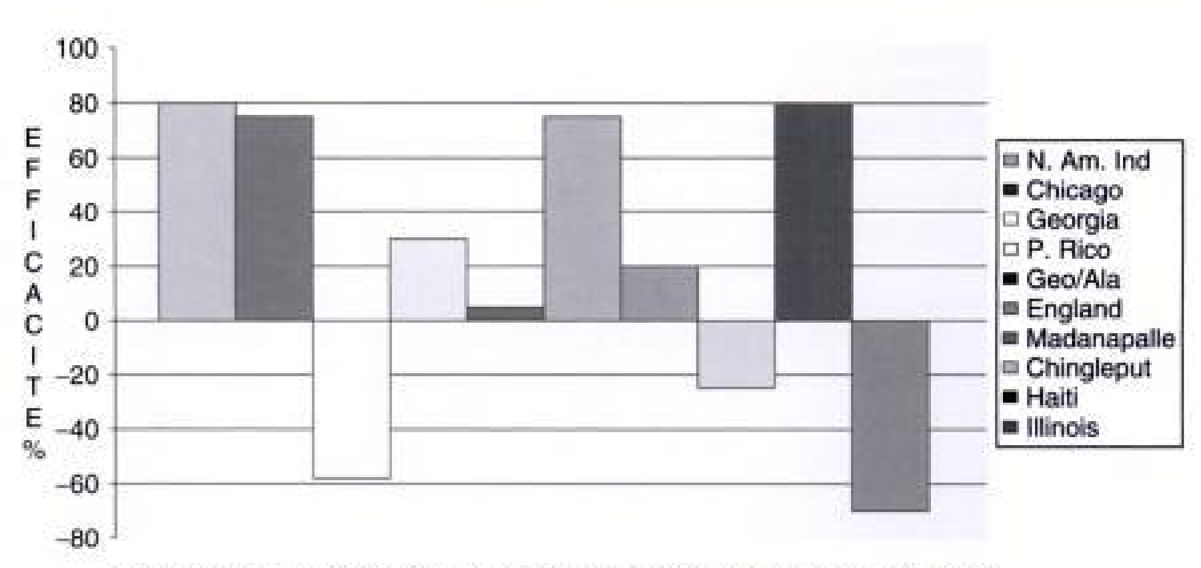


Figure 13.2. Efficacité vaccinale du BCG au cours de dix essais cliniques, 1935–1970.

porté sur la vaccination des nouveau-nés et des nourrissons, a montré une protection contre l'ensemble des formes de tuberculose de l'ordre de 50 %.
En tout état de cause, la protection conférée par le BCG entraîne essentiellement une protection individuelle du sujet vacciné. En effet, le BCG protège contre les formes extrapulmonaires de l'enfant, qui ne sont pas des maladies contagieuses, et probablement dans une certaine mesure contre les formes pulmonaires de l'enfant, exceptionnellement bacillifères. Ce vaccin n'a donc pratiquement pas d'impact sur la circulation du bacille tuberculeux, liée à la fréquence de la tuberculose pulmonaire de l'adulte, forme sur laquelle le BCG n'est très vraisemblablement pas efficace. Il s'agit donc d'un vaccin que l'on peut qualifier d'« égoïste », sans effet de protection collective, ce qui explique le peu de différence dans les tendances épidémiologiques globales de la tuberculose entre des pays, a priori relativement comparables, vaccinant ou ne vaccinant pas avec le BCG.
Cependant, le suivi de l'épidémiologie de la tuberculose dans les pays qui ont décidé d'interrompre la vaccination BCG confirme l'impact de cette décision sur l'incidence de la tuberculose de l'enfant.

9. Impact épidémiologique de la primovaccination BCG

Plusieurs publications relatent l'impact d'une modification de la politique de vaccination BCG sur l'épidémiologie de la tuberculose.

9.1. Expérience suédoise d'arrêt de la vaccination

En 1975, la Suède a décidé d'interrompre la vaccination systématique des nouveau-nés.
L'incidence globale de la tuberculose a continué à décroître au même rythme après la vaccination qu'avant. Cependant, chez les enfants, une légère

augmentation du nombre de cas a été observée après 1975. Cette augmentation a surtout porté sur les enfants étrangers âgés de zéro à neuf ans. Les autorités de santé ont donc renforcé au début des année 80 la recommandation de vaccination des enfants à risque élevé de tuberculose (essentiellement les enfants issus de familles venant de pays à forte prévalence, qu'ils soient nés en Suède ou à l'étranger). La diminution du nombre de cas de tuberculose chez ces enfants entre 1981 et 1985, concomitante d'une augmentation de la couverture vaccinale dans cette population, de 35 à 79 %, a permis d'estimer l'efficacité du BCG entre 62 et 85 %. Cependant, à la fin des années 1980, malgré cette vaccination sélective, l'incidence de la tuberculose restait supérieure chez les enfants de parents étrangers à celle observée chez les enfants de parents suédois.

9.2. Expérience tchèque d'arrêt de la vaccination

La vaccination BCG systématique des nouveau-nés a été interrompue dans une région de la République tchèque en 1986 et remplacée par une vaccination sélective des enfants à risque (enfants vivant au contact de malades tuberculeux ou enfants pour lesquels un suivi tuberculinique régulier paraissait difficile). Comme en Suède, une augmentation de l'incidence de la tuberculose chez l'enfant a été observée et l'efficacité du BCG, calculée par comparaison avec l'incidence de la tuberculose chez l'enfant dans le reste du pays a été estimée entre 65 et 80 %. Cependant, le faible excès de cas observé, lié à l'interruption de la vaccination systématique, a été jugé par les auteurs être compensé par le bénéfice apporté par la possibilité d'utiliser le test tuberculinique comme outil de diagnostic de l'infection tuberculeuse.

9.3. Expérience allemande d'arrêt de la vaccination

En juin 1975, la vaccination BCG des nouveau-nés a été totalement interrompue en RFA alors qu'elle était maintenue en RDA. À partir d'août 1977, elle a légèrement repris mais la couverture est restée inférieure à 10 %. Pendant la période du 1er juin 1977 au 31 décembre 1978, à l'issue d'une surveillance active dans les deux pays, 57 cas de méningites tuberculeuses ont été diagnostiqués en RFA pour une cohorte de naissance de 2,1 millions de nouveau-nés alors qu'en RDA, où la couverture des nouveau-nés était proche de 100 %, aucune méningite tuberculeuse n'a été notifiée pour une cohorte de naissance de 0,8 million de nouveau-nés. Les auteurs insistent sur la similitude de la situation épidémiologique de la tuberculose en 1975 entre les deux pays et de l'accès et de la qualité des soins. Ils concluent à l'intérêt de la vaccination BCG dans la prévention des méningites tuberculeuses de l'enfant, même dans les pays de faible endémicité de tuberculose.

9.4. Expérience irlandaise de diversité des politiques vaccinales BCG

Une comparaison des motifs d'hospitalisation entre les comtés où la vaccination BCG était pratiquée à la naissance et ceux où elle ne l'était pas a été effectuée en Irlande pour la période 1981–1989. Elle a montré un risque

Hidden page

enfants. Plusieurs scénarios de vaccination ciblée peuvent a priori être envisagés. Un premier scénario consisterait à maintenir la primovaccination uniquement dans les régions qui ne satisfont pas au critères UICTMR concernant l'incidence des formes BAAR+ (taux d'incidence annuel des cas BAAR+ supérieur à 5 pour 100 000 habitants), paramètre reflétant l'intensité de la transmission. Trois des 22 régions métropolitaines seraient concernées (Île-de-France, Bretagne et PACA). Cependant, le scénario ci-dessus laisserait sans protection vaccinale les jeunes enfants appartenant à des groupes à risque et vivant dans des régions de faible endémie tuberculeuse, qui contribueraient dans une proportion estimée entre 15 et 45 % aux formes extrapulmonaires évitables par la vaccination. La Fig. 13.3 montre que l'incidence des formes BAAR+ est, chez les sujets de nationalité étrangère, supérieure au seuil de cinq cas pour 100 000 habitants dans toutes les régions métropolitaines. Un scénario alternatif consisterait donc en une vaccination systématique au sein des régions de forte incidence, associée à la vaccination des populations à risque dans l'ensemble du pays.

La décision d'une remise en cause de la primovaccination systématique apparaît donc complexe. L'analyse épidémiologique des bénéfices actuels de la vaccination BCG, mesurés en nombre de cas de tuberculose évités, devra, avant qu'un processus décisionnel puisse être engagé, être mise en balance avec la prise en compte des effets négatifs du BCG, en particulier les exceptionnelles mais redoutables BCGites disséminées. De par les grandes difficultés auxquelles se heurteront les modalités opérationnelles de définition des

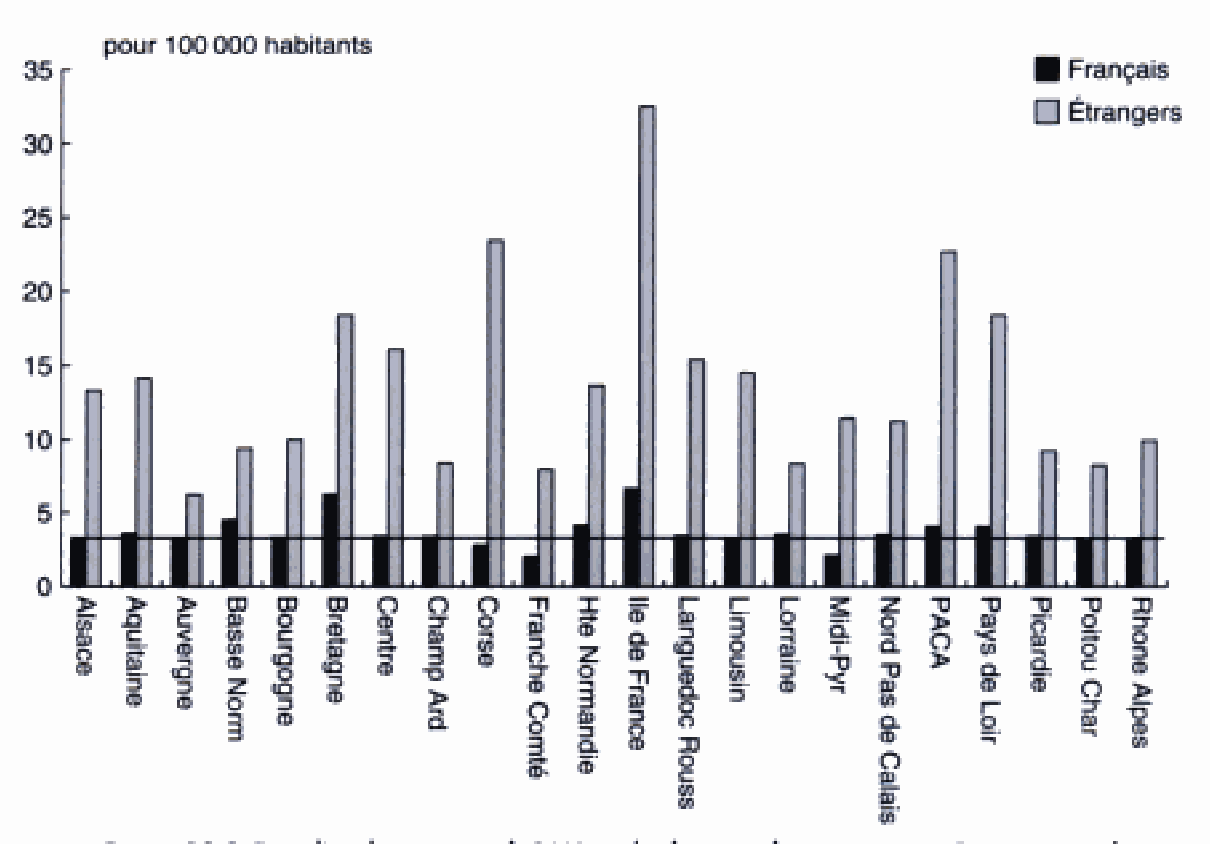


Figure 13.3. Taux d'incidence moyen de BAAR+ selon la nationalité et par région. France métropolitaine, 1997–99 (corrigé sur la base d'un taux d'exhaustivité de 80 % identique pour les deux populations).

superficielles de la vessie. L'élimination urinaire après instillation est importante chez la plupart des malades le jour de l'instillation, elle diminue ensuite rapidement mais peut se prolonger jusqu'au cinquième jour après l'instillation. Cette notion peut être importante dans les microbiologistes.

13. Vers de nouveaux vaccins

La protection conférée par le BCG étant insuffisante, il est nécessaire de développer d'urgence de nouvelles stratégies vaccinales.
Un certain nombre de voies sont envisagées (Tableau 13.1) :
– souches vivantes atténuées ; on a développé des :
• mutants nutritionnels auxotrophes de BCG voire de *Mycobacterium tuberculosis* ;
• BCG modifiés génétiquement avec une activité diminuée en superoxyde dismutase ;
• souches de *Mycobacterium microti* ou *Mycobacterium vaccae* surexprimant l'Ag 85, confèrant une immunité croisée.
De telles souches recombinantes protègent souris et cobayes, mais leur innocuité doit être vérifiée avant de procéder à des essais chez l'homme ;
– sous-unités comportant des antigènes conférant une protection :
• ESAT/Ag 85B, combinaison d'antigènes très immunogènes ;
• Mtb72f, combinaison de Mtb39, protéine de membrane associée avec une sérine protéase modifiée Mtb32 ;
• une combinaison d'épitopes CD4 et CD8 : huit épitopes MTB.
L'une des illustrations des possibilités offertes par les nouvelles techniques de génomique et tout particulièrement de la protéomique consiste dans la comparaison des souches de *M. tuberculosis* et de *M. bovis* BCG.
Jugblut et al. ont, en utilisant une approche dite Maldi-Tofms (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)*, identifié 263 protéines. Huit de ces protéines sont spécifiques du BCG alors que 13 le sont

Tableau 13.1
Différentes approches de la vaccination antituberculeuse

Vaccins vivants atténués
→ Actuel : *Mycobacterium bovis* BCG
→ Recherche :
Mycobacterium microti
Mycobacterium tuberculosis (mutant auxotrophe)
→ Vecteurs produisant les antigènes mycobactériens (bactéries, autres germes, virus...)
Bactéries entières tuées
→ *Mycobacterium bovis* BCG
Constituants bactériens purifiés
→ Antigènes :
• Communs : *M. tuberculosis/M. bovis*
• Spécifiques : *M. tuberculosis*
• Mélange d'antigènes
→ ADN fragments codant pour antigènes induisant des anticorps protecteurs
Combinaison des différentes approches précédentes

de *M. tuberculosis* et, de ce fait, sont susceptibles d'être utilisées comme cibles de futurs vaccins. Même si on cible mieux le choix des épitopes immunogènes, l'avenir repose probablement sur une association, un cocktail de plusieurs (nombreux ?) antigènes ;
– corps bactériens entiers tués (*M. vaccae*) décevants à ce jour ;
– vaccins ADN codant différentes protéines ; plusieurs approches ou mélanges ont été étudiés :
• HSP65, antigène de *M. tuberculosis* hautement conservé avec *M. lepte* ;
• Ag85, antigène sécrété par *M. tuberculosis* ;
• 35 kDa, 38 kDa (lipoprotéine), 65 kDa... ;
• MPT-63, MPT-64, MPT-65, MPT-70, MPT-83 ;
• ESAT-6, MPT-63, MPT-64, Kat G ;
• Mtb39.

Ces vaccins ADN ont été utilisés sur modèles souris, voire cobayes, montrant une certaine protection sur ces animaux, notamment pour HSP65 et Ag85.

Mais la transposition des essais à l'homme des vaccins ADN est difficile en raison des effets secondaires potentiels redoutés chez celui-ci : risque d'intégration, stimulation trop prolongée des réponses immunitaires pouvant aboutir à un état de tolérance...

Au total, il faut disposer d'antigènes reconnus par tous les individus induisant une réponse protectrice mais ne provoquant pas de réactions immunitaires de trop grande ampleur qui risqueraient d'être néfastes. Ces antigènes doivent être délivrés soit sous forme purifiée, soit par le biais de vaccins ADN, soit enfin par des bactéries recombinantes, à la condition que les vecteurs soient sans risques pour les patients.

Même si les instituts américains de la santé, la fondation Bill et Melinda Gates et la commission européenne financent d'importants programmes de recherche, même si différents groupes pharmaceutiques investissent dans le domaine des vaccins antituberculeux, on est encore loin d'un vaccin idéal facile à administrer, efficace, bien toléré et conférant une protection prolongée.

On ne peut que souscrire aux conditions auxquelles devraient répondre ce ou ces nouveau(x) vaccin(s), conditions énumérées par Van Reyn et Vuolla :
– induire une réponse cellulaire et humorale ;
– être immunogénique chez les nouveau-nés et les adultes déjà infectés ;
– être immunogénique chez les patients infectés par le VIH ;
– être efficace contre les formes primaires de tuberculose, incluant les formes pulmonaires et disséminées ;
– être efficace contre la réactivation, incluant les formes pulmonaires, extrapulmonaires et disséminées ;
– être efficace chez des personnes déjà immunisées par le BCG ;
– induire une immunisation prolongée et/ou induire un effet de rappel ;
– être sans danger chez les nouveau-nés, les adultes, les personnes immunodéprimées, y compris celles infectées par le VIH ;
– être d'un coût faible et être administré en une seule prise.

À l'évidence, nous sommes d'accord avec Lagrange et al. pour rajouter une condition opérationnelle majeure qui permettrait de lui associer la mise au point et le développement d'un ou de plusieurs tests immunologiques témoins de l'immunité acquise ou de la protection induite par le vaccin, qui devraient être différents de ceux mesurant l'infection chez les patients.

Il faut souhaiter que grâce aux progrès obtenus au niveau moléculaire avec le séquençage complet de *M. tuberculosis* et d'autres mycobacteries et grâce à une meilleure connaissance de la physiopathologie et de l'immunologie de la tuberculose, on parvienne dans un avenir proche au développement d'un vaccin répondant mieux que le BCG aux exigences que l'on peut attendre d'un vaccin destiné à la planète.

Pour en savoir plus

Agger EM, Andersen P. A novel TB vaccine : towards a strategy based on our understanding of BCG failure. Vaccine 2002 ; 21 : 7-14.

Behr MA, Small PM. A historical and molecular phylogeny of BCG strains. Vaccine 1999 ; 17 : 915-2 .

Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. Science 1999 ; 284 : 1520-3.

Blond O. Faut-il supprimer le BCG ? La vaccination systématique remise en cause. La Recherche 2002 ; 356 : 66-9.

Bloom BR, Fine PEM. The BCG experiences : implications for future vaccines against tuberculosis. In : BR Bloom ed. Tuberculosis : pathogenesis, protection and control. American Society for Microbiology. Washington ; 1994. p 631-57.

Bona HC, Menut P. Encensé ou vilipendé, le BCG ne s'est pas imposé sans peine. La longue marche d'un vétéran. La Recherche 2002 ; 356 : 70-3.

Colditz GA, Berkey CS, Mosteller F, Brewert F, Wilson ME, Burdick E, et al. The efficacy of bacillus Calmette-Guerin vaccination of newborns and infants in the prevention of tuberculosis : meta-analysis of the published literature. Pediatrics 1995 ; 96 : 29-35.

Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV, et al. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. JAMA 1994 ; 271 : 698-702.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature 1998 ; 393 : 537-44.

Fine PEM. Variation in protection by BCG : implications of and for heterologous immunity. Lancet 1995 ; 346 : 1339-45.

Gicquel B. Recherche de nouveaux vaccins contre la tuberculose. Bull Acad Med 1999 ; 183 : 1345-4.

Grandi G. Antibacterial vaccine design using genomics and proteomics. Trends Biotechnol 2001 ; 19 : 181-8.

Grenier B. Les tests tuberculiniques. Technique, interprétation et valeurs informatives. Med Mal Inf 1995 ; 25 : 411-20.

International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Criteria for discontinuation of vaccination programmes using bacille Calmette-Guérin (BCG) in countries with a low prevalence of tuberculosis. Tuber Lung Dis 1994 ; 75 : 179-80.

Jungblut PR, Schaible UE, Mollenkopf HJ, Zimny-Arndt V, et al. Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains : towards functional genomics of microbial pathogens. Mol Microbiol 1999 ; 33 : 1103-17.

Karonga Prevention Trial Group. Randomized controlled trial of single BCG, repeated BCG, or combined BCG and killed *Mycobacterium leprae* vaccine for prevention of leprosy and tuberculosis in Malawi. Lancet 1996 ; 348 : 17-24.

Kubit S, Czajka S, Olakowski T, Piasecki Z. Effectiveness of BCG vaccination. Pediatr Pol 1983 ; 58 : 775-81.

Lagrange P. Vaccination antituberculeuse par le BCG : historique d'une découverte et de ses controverses. Médecine-Sciences 1998 ; 14 : 314-9.

Lagrange P, Wargnier A, Herrmann JL. Historique de la vaccination antituberculeuse et actualités du BCG. Bull Ass Anc El Inst Pasteur 2002 ; 173 : 167-77.

Leung CC, Tam CM, Chan SL, Chan-Yeung M, Chan CK, Chang K. C. Efficacy of the BCG revaccination programme in a cohort given BCG vaccination at birth in Hong Kong Int J Tuberc Lung Dis 2001 ; 5 : 717-23.

Levy-Bruhl D, Barrault Y, Decludt B, Schwoebel V. Impact épidémiologique d'une modification de la politique de vaccination par le BCG en France. Revue de la littérature et analyse des données disponibles. Institut de Veille Sanitaire, Ed. Saint Maurice ; 2001, 42 p.

Levy-Bruhl D. BCG : nouvelles recommandations. In : Bouvet E, Régnier B, Vilde JL, Yeni P, Eds. Tuberculose : une maladie toujours d'actualité. Paris : EDK ; 2002. p 63-70.

Lugosi L. Theoretical and methodological aspects of BCG vaccine from the discovery of Calmette and Guerin to molecular biology : a review. Tuber Lung Disease 1992 ; 73 : 252-61.

Marchal G, Eyquem A. Vaccination par le BCG. In : Eyquem A, Alouf J, Chippaux A, Eds. Manuel des vaccinations et d'immunoprévention. Padoue : Piccin ; 1998. p 173-80.

Medical Research Council. BCG and whole bacillus vaccines in the prevention of tuberculosis in adolescence and early life. Bull WHO 1972 ; 46 : 371-85.

Morris S, Kelley C, Howard A, Li Z, Collins F. The immunogenicity of single and combination DNA vaccines against tuberculosis. Vaccine 2000 ; 18 : 2155-63.

Neyrolles O, Gicquel B. La tuberculose : mythes et réalités. Pour la Science 2003 ; 303 : 47-53.

Olivier C. BCG et tuberculose infantile en France. Concours Med 2000 ; 122-11 : 754-8.

Portaels F, Aguiar J, Debacker M, Steunou C, Zinsou C, Guedenon A, et al. Prophylactic effect of *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against osteomyelitis in children with *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer). Clin Diagn Lab Immunol 2002 ; 9 : 1389-91.

Rodrigues LC, Smith PG. Tuberculosis in developing countries and methods for its control. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1990 ; 84 : 739-4.

Rodriguez LC, Diwan VK, Wheeler JG. Protective effect of BCG against tuberculous meningitis and miliary tuberculosis : a meta-analysis. Int J Epidemiol 1993 ; 22 : 1154-8.

Romanus V, Svensson A, Hallander HO. The impact of changing BCG coverage on tuberculosis incidence in Swedish-born children between 1969 and 1989. Tuber Lung Disease 1992 ; 73 : 150-61.

Sepulveda RL, Parcha C, Sorenson RU. Case-control study of the efficacy of BCG immunization against pulmonary tuberculosis in young adults in Santiago, Chile. Tuber Lung Disease 1993 ; 73 : 372-7.

Tala-Heikkilä MM, Tuominen JE, Tala EO. Bacillus Calmette-Guérin revaccination questionable with low tuberculosis incidence. Am J Respir Crit Care Med 1998 ; 157 : 1324-7.

Trnka L, Dankova D, Svandova E. Six years' experience with the discontinuation of BCG vaccination. Tuber Lung Disease 1993 ; 74 : 167-72.

Ulmer JB. Tuberculosis DNA vaccines. Scand J Infect Dis 2001 ; 33 : 246-8.

Van Reyn CF, Vuolla JM. New vaccines for the prevention of tuberculosis. Clin Infect Dis 2002 ; 35 : 465-74.

Wasz-Hockert O, Genz H, Landmann H, Ocklitz HW. Influence de la vaccination des nouveau-nés par le BCG sur l'incidence des méningites tuberculeuses postprimaires chez l'enfant. Bulletin de l'UICTMR 1988 ; 63 : 52-4.

WHO Global Tuberculosis Programme and Global Programme on Vaccines. Statement on BCG revaccination for the prevention of tuberculosis. WHO Wkly Epidem Rec 1995 ; 70 : 229-31.

Mycobacterium tuberculosis et mycobactéries atypiques

Chapitre 14

Mycobactéries et maladies inflammatoires chroniques d'étiologie inconnue

Patrick Berche

Maladie de Crohn

***Mycobacterium paratuberculosis*, maladie de Johne et maladie de Crohn**

Sarcoïdose

Maladie de Takayasu

Artérite de Takayasu et *Mycobacterium tuberculosis*

Les mycobactéries ont été incriminées dans la genèse de certaines maladies inflammatoires chroniques, telles que la sarcoïdose, la maladie de Crohn ou la maladie de Takayasu. Ces maladies sont en effet associées à des granulomes inflammatoires non caséeux, évoquant une étiologie infectieuse. En effet, on sait que certaines espèces de mycobactéries à croissance lente, telles que *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium leprae*, responsables de la tuberculose et de la lèpre, persistent pendant des années dans les tissus des patients infectés avec des lésions granulomateuses chroniques. Cependant, rien n'est plus difficile dans certains cas que d'affirmer un lien de causalité entre un agent infectieux et une maladie chronique (Berche, 1998). Remplir les critères des postulats de Koch-Henlé, notamment isoler le microorganisme incriminé dans les tissus infectés et reproduire la maladie expérimentalement, est souvent impossible. À ces critères, on substitue souvent les notions d'association entre la maladie et la mise en évidence d'un agent infectieux dans les tissus infectés, d'exposition plus fréquente des patients à un risque infectieux, ou encore d'une efficacité d'un traitement spécifique d'un germe suspecté. On verra dans le présent chapitre que la mise en évidence de cette association reste difficile et d'interprétation délicate dans le cas de la maladie de Crohn, de la sarcoïdose et de la maladie de Takayasu. L'étiologie mycobactérienne de ces maladies inflammatoires chroniques reste hypothétique et controversée.

1. Maladie de Crohn

La maladie de Crohn est un processus inflammatoire chronique du tube digestif caractérisé par la présence dans la muqueuse de granulomes non caséeux (Shanahan, 2002 ; Podolsky, 1991). Les lésions sont localisées à la partie distale de l'intestin grêle et au côlon, mais peuvent s'étendre à l'ensemble du tube digestif, et éventuellement à distance avec des localisations musculaires, synoviales, osseuses et cutanées (notamment érythème noueux). Les patients souffrent chroniquement d'une perte de poids, de douleurs abdominales, de diarrhées ou de constipation, de vomissements et de malaise général. Les premiers signes de la maladie apparaissent surtout de 14 à 25 ans, avec parfois dans certains pays un second pic à 55–60 ans. Environ 5 % des patients ont moins de 10 ans et 65 à 85 % ont moins de 40 ans (Calkins et Medeloff, 1984 ; Sonnenberg, 1986 ; Sonnenberg et al., 1991 ; Mayberry et al., 1984). Il ne semble pas exister de prédominance en fonction du sexe. La maladie évolue par poussées, nécessitant dans plus de deux tiers des cas, après plusieurs années d'évolution, la résection du segment intestinal lésé. La plupart des patients souffrent de rechutes, nécessitant une chirurgie itérative.

1.1. Épidémiologie de la maladie de Crohn

La maladie de Crohn est surtout retrouvée dans certains pays occidentaux, tels que le nord des États-Unis, la Scandinavie, le Royaume-Uni et la France. Cette maladie, qui semble s'étendre selon un gradient Nord-Sud, est rare en Afrique, en Asie et en Amérique du Sud. L'incidence annuelle aux États-Unis oscille entre 3,1 et $13,5/10^5$ habitants, ces taux atteignant généralement 0,3 à 7,3 dans d'autres pays (Calkins et Medeloff, 1984 ; Sonnenberg, 1986 ;

Sonnenberg et al., 1991 ; Mayberry et al., 1984). En France, la région Nord-Pas-de-Calais est particulièrement touchée, avec une incidence annuelle de 2,1 (Gottrand et al., 1991), comparable à celle des pays du Nord à forte incidence (Danemark, Suède, Norvège, Écosse...). Fait frappant, la maladie se répartit par foyers à très forte incidence (taux annuel > 6,0). Enfin, la maladie est en augmentation constante depuis une cinquantaine d'années, sans que cette augmentation ait pu être rattachée à un meilleur recueil des données ou à des biais liés à un meilleur établissement du diagnostic.

1.2. Sensibilité génétique à la maladie de Crohn

L'existence de cas familiaux de maladie de Crohn plaide en faveur d'une origine génétique de cette maladie. L'analyse de plusieurs centaines de patients montre l'existence d'un risque fortement accru de voir apparaître la maladie chez des membres de la famille proche : 5 à 10 % des malades ont des parents (ascendants, fratrie, cousins) souffrant de la maladie. De plus, le risque de contracter la maladie est 30 fois plus élevé chez les vrais jumeaux, même séparés, et 13 fois plus élevé chez les proches parents (Orholm et al., 1991 ; Farmer et al., 1980 ; Fielding, 1986). Récemment, un locus de sensibilité à la maladie a été identifié sur la région centromérique du chromosome 16, le locus IBD1 (*inflammatory bowel disease 1*), permettant d'identifier le gène *NOD2*. Une association entre des mutations de ce gène et la maladie a été mise au jour. Le risque de la maladie est augmenté d'un facteur 3 chez les hétérozygotes et d'un facteur 40 chez les homozygotes porteurs de ces mutations. Exprimée seulement dans les monocytes, la protéine NOD2 est un récepteur cytoplasmique de constituants bactériens tels que le LPS, ce qui pourrait expliquer le rôle éventuel de la flore digestive à bactéries à Gram négatif dans les poussées de la maladie. Ce récepteur active en effet le facteur NF-kB qui induit la transcription du TNF et de nombreuses cytokines, expliquant la réponse inflammatoire intestinale (Fig. 14.1 et 14.2). Les corticoïdes sont le traitement majeur de la maladie au cours des poussées et précisément inhibent l'activation de NF-kB et ses conséquences. Des mutations de NOD2 ne sont retrouvées que dans moins de 20 % des cas. D'autres loci de sensibilité sont suspectés : IBD2 (chromosome 12, gènes candidats INFγ, NRAMP2, récepteur de la vitamine D), IBD3 (chromosome 6, MHC), IBD4 (chromosome 14, TCR$\alpha\delta$; chromosome 19, ICAM1, C3, récepteur du thromboxane A2... ; chromosome 5, IL3, IL4, IL5, IL13, CSF2) (Hugot et al., 2001 ; Ogura et al., 2001 ; Hampe et al., 2001 ; van Heel et al., 2001 ; Mahida et Johal, 2001).

1.3. Maladie de Crohn et mycobactéries

En plus du rôle clairement établi de facteurs génétiques, certaines observations orientent vers la mise en cause d'un agent infectieux. On a décrit des cas familiaux touchant des couples non apparentés contractant la maladie successivement à plusieurs années de distance après leur rencontre, environ entre quatre et huit ans (Lobo et al.,1988 ; Rhodes et al., 1985 ; Holmes et al.,1986 ; Darchis et al., 1989 ; Van Kruningen et al., 1993 ; Bennett et al.,1991). De plus, les données épidémiologiques montrant la progression régulière de la maladie,

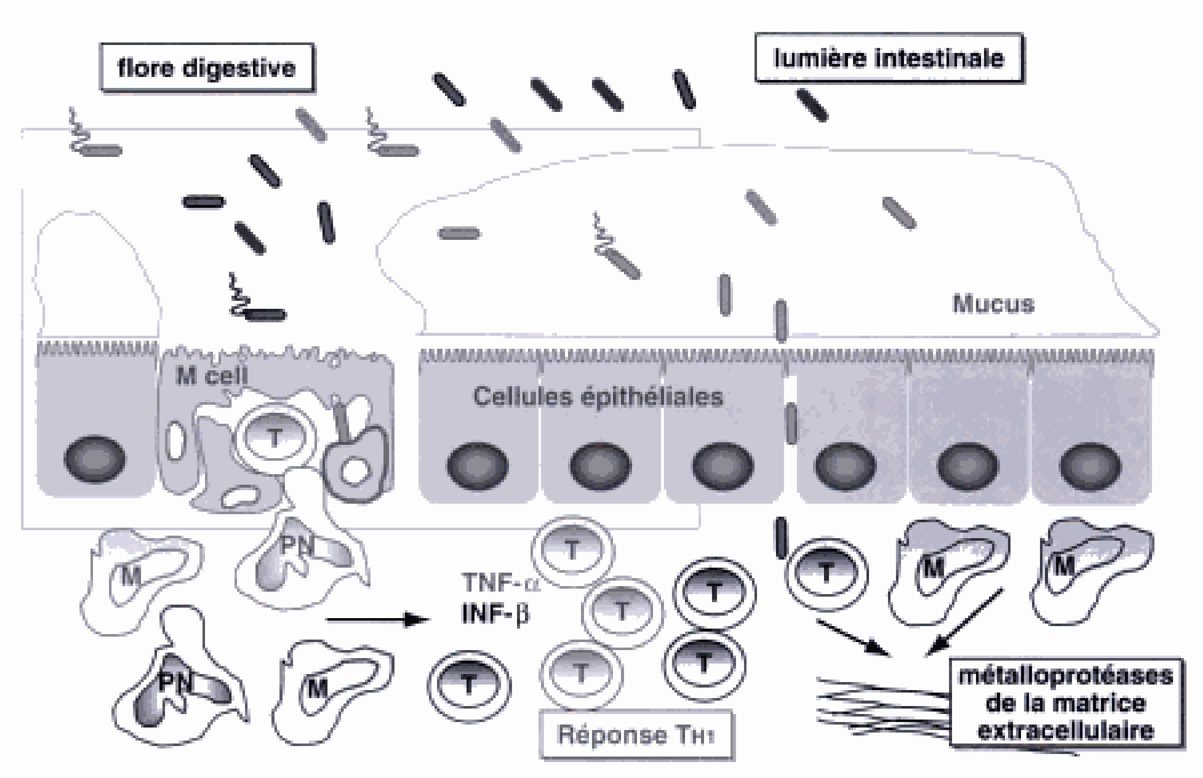


Figure 14.1. Physiopathologie de la maladie de Crohn.
L'activation des cellules T et des macrophages par un agent inducteur (mycobactérie ?) induit une réponse de type TH1 avec production de TNF et INF. Ceci entraîne une activation des métallo-protéases de la matrice extracellulaire qui détruit le tissu stromal. Le recrutement des polynucléaires neutrophiles circulants aggrave les lésions tissulaires et la destruction tissulaire.

la répartition en foyers parfois très actifs et les cas familiaux évoquent le rôle d'un agent infectieux transmissible. La distribution de la maladie en fonction de l'âge, montrant la rareté avant dix ans, et la cinétique d'apparition des cas familiaux survenant par vagues avec des décalages de plusieurs années, pourraient plaider en faveur d'une maladie infectieuse à incubation longue liée à un agent infectieux à réplication lente, rappelant de façon frappante l'épidémiologie de la lèpre qui épargne aussi les jeunes enfants. Cette longue incubation signifierait aussi que la contamination a probablement lieu dans la petite enfance pour la majorité des patients atteints entre l'âge de dix et 20 ans. Enfin, l'existence de longues phases de latence avec des poussées de survenue imprévisible évoque la possibilité d'un agent infectieux quiescent, avec des reprises évolutives déclenchées par des stimuli environnementaux.

2. *Mycobacterium paratuberculosis*, maladie de Johne et maladie de Crohn

De nombreuses étiologies infectieuses ont été avancées, incluant le virus de la rougeole et *Listeria monocytogenes*. Cependant, l'hypothèse d'une mycobactérie à l'origine de la maladie, suspectée dès la description anatomopathologique des lésions granulomateuses en 1913 (Dalziel, 1913) est considérée comme la plus étayée (Hermon-Taylor et Quirke, 2001). Diverses mycobactéries atypiques (*Mycobacterium kansasii, Mycobacterium chelonae, Mycobacterium fortuitum,*

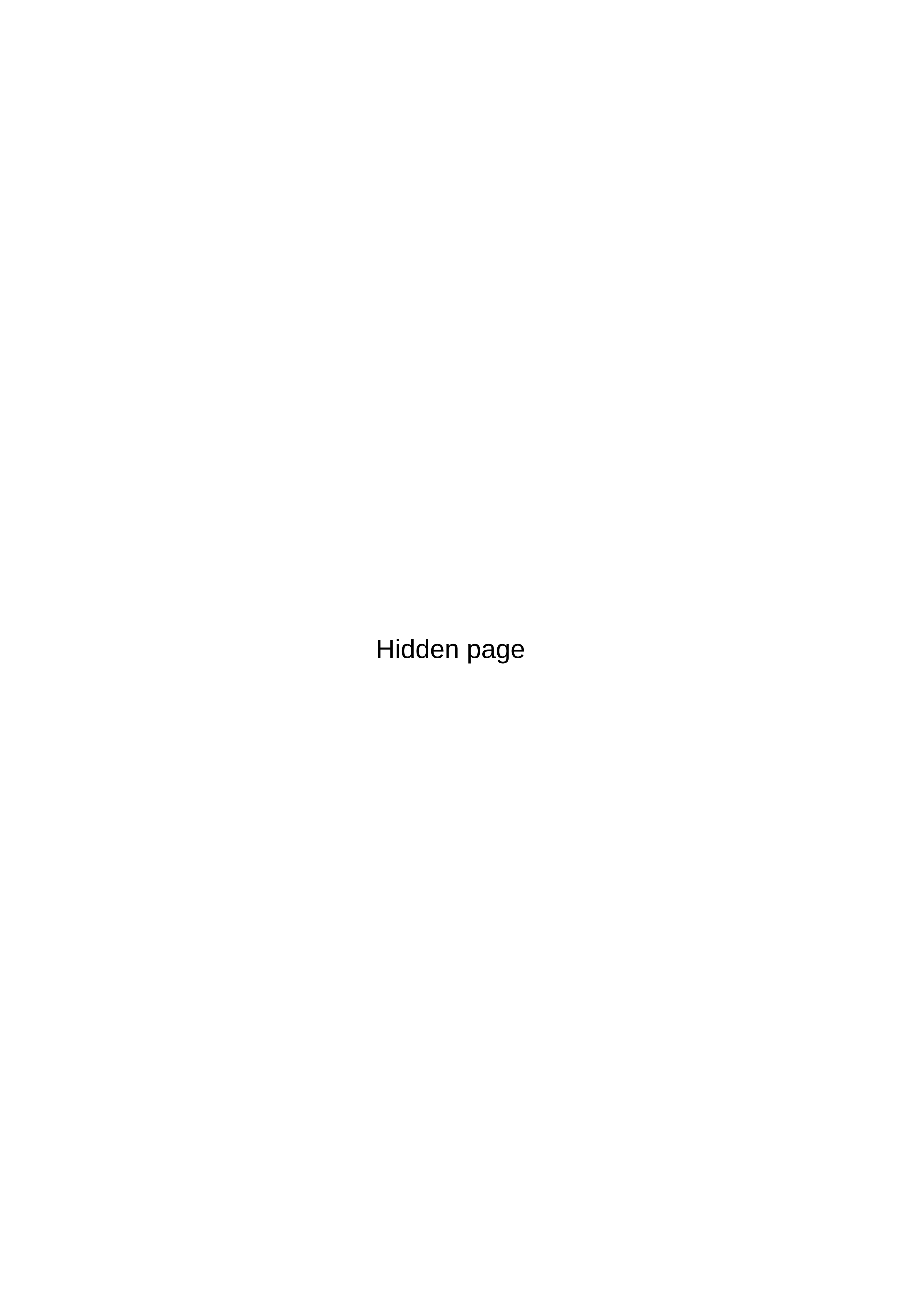

Hidden page

Tableau 14.1 *(suite)*

Reférences	ADN-cible	Contrôles*	Colite ulcéreuse	Maladie de Crohn
Riggio et al., 1997	IS*900*	0/12 (0 %)	–	0/7 (0 %)
Clarkston et al., 1998	IS*900*	0/11 (0 %)	0/5 (0 %)	1/21 (5 %)
Cellier et al., 1998	16S rRNA**	2/20 (10 %)	1/27 (4 %)	2/47 (4 %)
	IS*900*	0/20 (0 %)	0/27 (0 %)	0/47 (0 %)
Chiba et al., 1998	IS*900*	0/3 (0 %)	0/14 (0 %)	0/30 (0 %)
Kanazawa et al., 1999	IS*900*	0/13 (0 %)	0/4 (0 %)	0/13 (0 %)
Tiveljung et al., 1999	16S rRNA	0/11 (0 %)	–	3/11 (27 %)
Ikonomopoulos et al., 2000	IS*1110* 16S rRNA	–	1/1 (100 %)	7/20 (35 %)
Gibson et al., 2000	IS*900*	0/12 (0 %)	–	0/3 (0 %)

*Contrôles : patients sans maladie inflammatoire intestinale ; **rRNA de mycobactérie.

régionales de l'exposition aux mycobactéries). Récemment, *M. paratuberculosis* a été mis en évidence dans les tissus par hybridation in situ chez 7/37 patients atteints de la maladie de Crohn contre 0/22 patients-contrôle (Hulten et al., 2001). Ces résultats qui méritent confirmation seraient un argument important en faveur d'un rôle étiologique de cette bactérie.

L'ensemble des faits rapportés rend plausible l'hypothèse d'un rôle de *M. paratuberculosis* dans la maladie de Crohn. On pourrait néanmoins objecter, à juste titre, que les mycobactéries sont rarement isolées en culture à partir des tissus de maladie de Crohn et ne sont jamais visibles à l'examen direct des granulomes inflammatoires. Les rares isolements rapportés pourraient n'être que la conséquence d'une contamination du tube digestif par des mycobactéries de l'environnement, plus facilement mis en évidence sur des biopsies ou pièces opératoires de tissus lésés non spécifiquement colonisés par les mycobactéries. Il est aussi assez étonnant que les traitements immunosuppresseurs, tels que les corticoïdes, l'imurel ou la ciclosporine, soient efficaces sur les poussées de la maladie, alors que l'on serait en droit d'attendre une exacerbation des poussées dans l'hypothèse d'une infection liée aux mycobactéries. L'efficacité des corticoïdes modérant les phénomènes inflammatoires au cours des poussées n'est pas absolument contradictoire avec une infection mycobactérienne chronique, car on sait, par exemple, que les corticoïdes sont efficaces sur les poussées observées dans certaines formes sévères de lèpre. La non-exacerbation de la croissance microbienne dans les tissus au cours des traitements immunosuppresseurs peut être pré-

cisément liée à ce faible taux de croissance et, surtout, au caractère modéré de l'immunosuppression. En revanche, la grossesse entraîne une exacerbation des poussées chez 30 à 50 % des patientes (Podolsky, 1991).
Dans l'hypothèse du rôle de *M. paratuberculosis* dans la maladie de Crohn, le scénario physiopathologique pourrait être le suivant. La contamination se ferait par voie orale à partir de l'environnement, probablement par de l'eau et du lait souillés par les mycobactéries provenant d'animaux malades ou excréteurs asymptomatiques. Cette contamination pourrait avoir lieu dans la petite enfance et être suivie d'une période d'incubation de cinq à dix ans, comme dans le cas de la lèpre. Pendant cette période, les bactéries coloniseraient les plaques de Peyer et les formations lymphoïdes du tube digestif, les sujets devenant excréteurs asymptomatiques et potentiellement contagieux. L'expression clinique de la maladie ne surviendrait que chez certains sujets génétiquement prédisposés. Les bactéries en très petit nombre persisteraient quiescentes dans les granulomes non caséeux, en dehors des poussées, peut-être sous forme de sphéroplastes, bactéries à paroi altérée qui peuvent reverser in vitro vers une forme bacillaire beaucoup plus immunogène après 18 mois de culture (Chiodini et al., 1986). Il a été proposé l'hypothèse que *M. paratuberculosis* pourrait persister dans les tissus sous forme de sphéroplastes à multiplication intracellulaire très lente, qui déclencheraient en reprenant leur forme bacillaire la réaction granulomateuse (Chiodini et al., 1986b). Les poussées pourraient donc être la conséquence d'une reprise très lente de la croissance bactérienne, ou de son extension à des tissus sains entraînant une nouvelle réponse inflammatoire. Certains stimuli, notamment alimentaires, pourraient favoriser la reprise de la croissance.
Ce scénario demeure hypothétique. Il n'exclut pas que l'entité nosologique de la maladie de Crohn sous-tende plusieurs espèces de mycobactéries à croissance lente, voire d'autres agents infectieux. Il n'apporte aucune réponse claire concernant les possibles relations entre la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, maladie exclusivement localisée à la superficie de la muqueuse colorectale et atteignant des patients de même âge, avec des formes familiales. S'il s'avérait exact, le scénario proposé permettrait de faire plusieurs prédictions. L'existence de foyers épidémiques devrait coïncider avec une infection massive du cheptel dans la région et avec des habitudes alimentaires particulières (absorption de lait cru à la ferme...) ; quoique peu probable, la possibilité que *M. paratuberculosis* échappe à la pasteurisation ne peut être formellement écartée. Les enfants allaités au sein devraient être moins exposés à la maladie que ceux nourris au lait de vache. L'existence d'un contact avec *M. paratuberculosis* relativement fréquent laisse prévoir l'apparition de cas de maladie de Crohn chez les patients atteints de sida. L'hypothèse a enfin le mérite d'ouvrir des perspectives prophylactiques et thérapeutiques. Les antibiotiques actifs sur *M. paratuberculosis*, tels que la clarithromycine, la rifabutine et l'éthambutol, devraient prévenir ou améliorer les poussées de la maladie, voire guérir les patients définitivement, à condition d'utiliser des traitements relativement longs et à doses fortes. De nombreux essais utilisant des antibiotiques actifs sur *M. paratuberculosis* ont été publiés, portant souvent sur un faible nombre de patients. Une méta-analyse récente de huit publications d'essais randomisés contre placebo (sur 29 essais publiés) suggère que l'antibiothérapie pourrait aider aux rémissions (Borgaonkar et al., 2000).

pompiers vivant en promiscuité (Parkes et al., 1987 ; Hilles et al., 1987 ; Edmonstone, 1988). Ceci suggère que la maladie peut être transmise de personne à personne ou à la suite d'une exposition commune à un même agent infectieux. De plus, des cas ont été rapportés de transmission par transplantation cardiaque et de moelle osseuse (Heyll et al., 1994 ; Burke et al., 1990).

3.2. Origine infectieuse de la sarcoïdose

Une origine infectieuse de la sarcoïdose est donc fortement suspectée et de nombreux agents infectieux ont été incriminés comme responsables de la sarcoïdose : mycobactéries, virus, mycoplasmes, *Nocardia*, corynébactéries, *Propionibacterium acnes*... (Mitchell, 1996 ; Mangiapan et al., 1995) et certaines mycobactéries, tout particulièrement *M. tuberculosis* du fait des similitudes cliniques et histologiques avec la tuberculose. En effet, le granulome inflammatoire présente les caractéristiques des granulomes de la tuberculose, mais sans caséum. De façon intéressante, la corticothérapie souvent utilisée au cours de la sarcoïdose est connue pour révéler une infection tuberculeuse latente chez ces patients (Scadding et al., 1987).

La recherche systématique de *M. tuberculosis* par culture dans les tissus de patients atteints de sarcoïdose a donné des résultats positifs chez une minorité de patients (American Thoracic Society, 1999). La recherche d'ADN bactérien par PCR à partir des tissus lésés a permis de mettre en évidence des séquences spécifiques de *M. tuberculosis* dans 10 et 64 % des prélèvements étudiés (Hance, 1998 ; Li et al., 1999), et aussi de l'ADN d'autres mycobactéries telles que *M. kansasii* et *M. interjectum* chez certains patients. De plus, une plus forte réponse anticorps contre *Mycobacterium xenopi* a été détectée chez des patients atteints de sarcoïdose par rapport à un groupe contrôle. En revanche, aucun ADN mycobactérien n'a pu être détecté dans les homogénats tissulaires de sarcoïdose utilisés dans le test de Kveim-Siltzbach (Richter et al., 1999). Rien ne permet donc d'affirmer avec certitude l'étiologie tuberculeuse de la sarcoïdose, mais ces bactéries pourraient dans un certain nombre de cas être impliquées comme facteur déclenchant de la réponse immunitaire au cours de cette maladie. Des succès thérapeutiques ont été rapportés en utilisant des antibiotiques contre les mycobactéries, mais aucune étude systématique pour le moment ne permet d'affirmer avec certitude l'efficacité de ces antibiotiques dans la sarcoïdose.

4. Maladie de Takayasu

La maladie de Takayasu (Takayasu, 1908) est une artérite inflammatoire chronique des gros vaisseaux artériels, tels que l'aorte et ses branches, les coronaires et les artères pulmonaires (Hotchi M, 1992 ; Nasu, 1963 ; Nasu, 1975 ; Hall et Buchbinder, 1990 ; Sekiguchi et Suzuki, 1992). Après un début insidieux, la maladie est d'évolution lente avec formation de sténoses artérielles et obstructions parfois associées à des anévrysmes. La maladie présente parfois des phases de rémission, souvent induites par le traitement par les corticoïdes ou les immunosuppresseurs. L'examen radiologique (angiographie IRM et Doppler) permet d'évoquer le diagnostic avec certitude au vu de

Clarkston WK, Presti ME, Petersen PF, et al. Role of *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease : a prospective, controlled study using polymerase chain reaction. Dis Colon Rectum 1998 ; 41 : 195-9.

Coloe P, Wilks CR, Lightfoot D, Tosolini FA. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease. Aust Microbiol 1986 ; 7 : 188A.

Dalziel TK. Chronic interstitial enteritis. Br Med J 1913 ; 2 : 1068-70.

Darchis I, Colombel JF, Cortot A, et al. Crohn's disease in a married couple and their four children. Lancet 1989 ; 2 : 737.

Dell'Isola B, Poyart C, Goulet O, et al. Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by polymerase chain reaction in children with Crohn's disease. J Infect Dis 1994 ; 169 : 449-51.

Dumonceau JM, Van Gossum A, Adler M, et al. No *Mycobacterium paratuberculosis* found in Crohn's disease using polymerase chain reaction. Dig Dis Sci 1996 ; 41 : 421-6.

Dumonceau JM, Van Gossum A, Adler M, et al. Detection of fastidious mycobacteria in human intestines by the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol Infect Dis 1997 ; 16 : 358-63.

Edmondstone WM, Wilson AG. Sarcoidosis in Caucasians, Blacks, and Asians in London. Br J Dis Chest 1985 ; 79 : 27-36.

Edmonstone WM. Sarcoidosis in nurses : is there an association ? Thorax 1988 ; 43 : 342-3.

Erasmus DL, Victor TC, van Eeden PJ, Falck V, van Helden P. *Mycobacterium paratuberculosis* and Crohn's disease. Gut 1995 ; 36 : 942.

Farmer RG, Michener WM, Mortimer EA. Studies of family history among patients with inflammatory bowel disease. Clin Gastroenterol 1980 ; 9 : 271-8.

Fidler HM, Thurrell W, Johnson NM, et al. Specific detection of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA associated with granulomatous tissue in Crohn's disease. Gut 1994 ; 35 : 506-10.

Fielding JF. The relative risk of inflammatory bowel disease among parents and sibs of Crohn's disease patients. J Clin Gastroenterol 1986 ; 8 : 655-7.

Frank TS, Cook SM. Analysis of paraffin sections of Crohn's disease for *Mycobacterium paratuberculosis* using polymerase chain reaction. Mod Pathol 1996 ; 9 : 32-5.

Gibson J, Riggio M, McCreary C, et al. Looking for *Mycobacterium paratuberculosis* DNA by polymerase chain reaction (PCR) in orofacial granulomatosis (OFG) and oral Crohn's disease tissue in an Irish population. Ir Med J 2000 ; 93 : 218.

Gitnick G, Collins J, Beaman B, et al. Preliminary report on isolation of mycobacteria from patients with Crohn's disease. Dig Dis Sci 1989 ; 34 : 925-32.

Gottrand F, Colombel JF, Moreno JL, et al. Incidence des maladies inflammatoires du tube digestif chez l'enfant dans la région Nord-Pas-de-Calais. Arch Fr Pediatr 1991 ; 48 : 25-8.

Haagsma J, Mulder CJJ, Eger A, et al. Mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease. In : Mc Dermott RP, ed. Inflammatory bowel disease : current status and future approach. Amsterdam : Excerpta Medica ; 1988. p. 535-7.

Hall S, Barr W, Lie JT, et al. Takayasu arteritis : a study of 32 North American patients. Medicine 1985 ; 64 : 89-99.

Hall S, Buchbinder R. Takayasu's arteritis. Rheum Dis Clin North Am 1990 ; 16 : 411-22.

Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJP, et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. Lancet 2001 ; 357 : 1925-8.

Hance AJ. The role of mycobacteria in the pathogenesis of sarcoidosis, Semin Respir Infect 1998 ; 13 : 197-205.

Henke CE, Henke G, Elveback LR, Beard CM, Ballard DJ, Kurland LT. The epidemiology of sarcoidosis in Rochester, Minnesota : a population-based study of incidence and survival. Am J Epidemiol 1986 ; 123 : 840-5.

Hermon-Taylor J, Quirke P. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* a cause of Crohn's disease. Gut 2001 ; 49 : 755-60.

Heyll A, Meckenstock G, Aul C, et al. Possible transmission of sarcoidosis via allogenic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transpl 1994 ; 14 : 161-4.

Hills SE, Parkes SA, Baker SB. Epidemiology of sarcoidosis in the Isle of Man. 2. Evidence for space-time clustering. Thorax 1987 ; 42 : 427-30.

Holmes JTK, Painter NS. Crohn's disease in married couples. Gut 1986 ; 27 : 350.

Hotchi M. Pathological studies on Takayasu's arteritis. Heart Vessels 1992 ; Suppl 7 : S11-17.

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature 2001 ; 411 : 599-603.

Hulten K, El-Zimaity HM, Karttunen TJ, et al. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Crohn's diseased tissues by in situ hybridization. Am J Gastroenterol 2001 ; 96 : 1529-35.

Ikonomopoulos JA, Gorgoulis VG, Kastrinakis NG, et al. Sensitive differential detection of genetically related mycobacterial pathogens in archival matériel. Am J Clin Pathol 2000 ; 14 : 940-50.

Kanazawa K, Haga Y, Funakoshi O, et al. Absence of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in intestinal tissues from Crohn's disease by nested polymerase chain reaction. J Gastroenterol 1999 ; 34 : 200-6.

Keller AZ. Hospital, age, racial, occupational, geographical, clinical and survivorship characteristics in the epidemiology of sarcoidosis. Am J Epidemiol 1971 ; 94 : 222-30.

Kinare SG. Aortitis in early life and its association with tuberculosis. J Pathol 1970 ; 100 : 69-76.

Kreuzpaintner G, Kirschner P, Wallner A, et al. Mycobacteria of Runyon groups I, II and IV do not play an aetiological role in Crohn's disease. Eur J Gastroenterol Hepatol 1995 ; 7 : 1177-82.

Li N, Bajoghli A, Kubba A, Bhawan J. Identification of mycobacteria DNA in cutaneous lesions of sarcoidosis. J Cutan Pathol 1999 ; 26 : 1-8.

Lisby G, Andersen J, Engbaek K, et al. *Mycobacterium paratuberculosis* in intestinal tissue from patients with Crohn's disease demonstrated by a nested primer polymerase chain reaction. Scand J Gastroenterol 1994 ; 29 : 923-9.

Lobo AJ, Foster PN, Sobala GM, Axon ATR. Crohn's disease in married couples. Lancet 1988 ; 1 : 704-5.

Mahida YR, Johal S. NF-KB may determine whether epithelial cell-microbial interactions in the intestine are hostile or friendly. Clin Exp Immunol 2001 ; 123 : 347-9.

Mangiapan G, Hance AJ. Mycobacteria and sarcoidosis : an overview and summary of recent molecular data. Sarcoidosis 1995 ; 12 : 20-37.

Mayberry JF, Rhodes J. Epidemiological aspects of Crohn's disease : a review of the littérature. Gut 1984, 25 : 886-99.

McFadden JJ, Butcher PD, Chiodini R, Hermon-Taylor J. Crohn's disease-isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. J Clin Microbiol 1987 ; 25 : 796-801.

Merkal RS, Whipple DL, Sacks JM, Snyder GR. Prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in ileo-coecal lymph nodes of cattle culled in the United States. J Am Vet Med Assoc 1987 ; 190 : 676-80.

Mishina D, Katsel P, Brown ST, et al. On the etiology of Crohn's disease. Proc Natl Acad Sci USA 1996 ; 93 : 9816-20.

Mitchell DN. Mycobacteria and sarcoidosis. Lancet 1996 ; 348 : 768-9.

Murray A, Oliaro J, Schlup MM, et al. *Mycobacterium paratuberculosis* and inflammatory bowel disease : frequency distribution in serial colonoscopic biopsies using the polymerase chain reaction. Microbios 1995 ; 83 : 217-28.

Mokresh AH, Czuprynski JC, Butler DG. A rabbit model for study of *Mycobacterium paratuberculosis* infection. Infect Immun 1989 ; 57 : 3798-807.

Mycobacterium tuberculosis et mycobactéries atypiques

La tuberculose connaît une certaine recrudescence. Elle demeure au niveau planétaire la première cause de mortalité due à un agent infectieux unique et les mycobactéries atypiques sont responsables d'infections préoccupantes.
Malgré l'importance du problème posé par ces infections qui sont loin d'être éradiquées, très peu d'études en langue française sont publiées sur ce sujet. Alors que les connaissances sur les mycobactéries ont considérablement évolué ces dernières années, un ouvrage actualisé pour le XXIe siècle était indispensable. Celui-ci met un accent tout particulier sur le diagnostic bactériologique de ces infections à l'ère génomique puisque l'on dispose depuis peu du séquençage de différentes mycobactéries.
Les nouveaux outils s'appliquent au diagnostic de *M. tuberculosis* et des mycobactéries atypiques, à l'étude des résistances aux antibiotiques et à l'épidémiologie moléculaire afin de pouvoir comparer et suivre la propagation des souches. Enfin, le problème du diagnostic, du contrôle et de la prévention des infections chez les enfants et les adultes est abordé sous différents aspects (au laboratoire, approches vaccinales, etc.)
Cet ouvrage, qui fait appel aux meilleurs spécialistes du sujet, est lisible à plusieurs niveaux, tant par le généraliste que par le spécialiste, et, d'une manière générale, par toutes les personnes concernées par les mycobactérioses, maladies encore sous-estimées sur lesquelles les progrès récents apportent un nouvel éclairage.

Coordinateurs

François Denis
Christian Perronne

Collection dirigée par

Jean-Claude Nicolas

Les auteurs

Patrick Berche
Christophe Billy
Emmanuelle Cambau
Caroline Debrock
Bénédicte Decludt
François Denis
Joël Gaudelus
M.-Cristina Gutierrez
Jean-Louis Hermann
Vincent Jarlier
Philippe-Henri Lagrange
Daniel Levy-Bruhl
Hélène Marchandin
Christian Martin
Marcelle Mounier
Christian Perronne
Marie-Cécile Ploy
Françoise Portaels
Jérôme Robert
Chantal Truffot-Pernot
David Trystram
Philippe Van de Perre
Nicolas Véziris
Véronique Vincent
Alain Wargnier

ISBN : 2-84299-590-2
ISSN : 1631-3623
45 €
MYB

